

領域略称名：構造細胞生物学
領域番号：3212

平成24年度科学研究費補助金「新学術領域研究
(研究領域提案型)」に係る研究経過等の報告書

「細胞シグナリング複合体によるシグナル検知・伝達・
応答の構造的基礎」

(領域設定期間)
平成22年～平成26年

平成24年6月

領域代表者 奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授・箱嶋敏雄

目次

1. 表紙	1
2. 目次	3
3. 研究領域の目的及び概要	4
4. 研究の進展状況	5
5. 研究を推進する上での問題点と今後の対応策	6
6. 主な研究成果（発明及び特許を含む）	
研究項目 A01	7
研究項目 A02	10
研究項目 A03	12
まとめ	14
7. 研究成果公表の状況（主な論文等一覧、ホームページ、公開発表等）	
(1) 主な論文等一覧	16
(2) ホームページ	25
(3) 公開発表等	25
(4) 「国民との科学・技術対話」	28
8. 研究領域の研究組織と各研究項目の連携状況	
(1) 連携状況	29
(2) 研究組織	30
9. 研究費の使用状況（設備の有効活用、研究費の効果的使用を含む）	32
10. 今後の研究領域の推進方策	33
11. 総括班評価者による評価の状況	34

3. 研究領域の目的及び概要

「細胞シグナリング複合体によるシグナル検知・伝達・応答の構造的基礎」

研究期間：平成22年度～平成26年度

研究代表者：奈良先端科学技術大学院大学・教授・箱嶋敏雄

年度	直接経費の額
平成22年度	249,000,000 円
平成23年度	262,600,000 円
平成24年度	259,500,000 円
小計	771,100,000 円

背景 タンパク質の三次元構造解析法の革新により、構造生物学は生命科学に大きく貢献するようになった。領域代表者は、2000年代に入ってから始まった隆盛を、「**構造生物学の第三の波**」と呼ぶ。この波は、分子細胞生物学やゲノム科学等の発展により、重要な機能をもつタンパク質群の単離が急増したことが背景にあり、今や、様々な生命現象を制御する重要なタンパク質群が形成する**分子複合体**の構造解析が挑戦可能となってきた。そこで、

目的 本研究領域では、細胞シグナルの複雑な伝達経路でシグナルの検出・伝達・応答を担うタンパク質が機能する現場で形成する分子複合体を「**細胞シグナリング複合体**」と定義して、複合体の構造研究で実績のある研究者が中心となって、複合体構造研究の基盤技術と戦略を整備するとともに若手を育成しつつ、分子複合体の高分解能の三次元構造を決定することで、高次の生命現象を支える重要なタンパク質群の相互作用の特異性と機能制御のメカニズムの詳細を原子分解能で解明する構造生物学領域を推進する。

具体的には、以下の3つの方向（研究項目）で研究を推進する。

研究項目A01 細胞内シグナルの検知と伝達の構造生物学

研究項目A02 核内シグナルの認識と応答の構造生物学

研究項目A03 医学上重要な分子複合体研究の構造生物学

概要 本研究領域で構造解析する試料の多くは、複雑な分子内相互作用が起こるマルチドメインのタンパク質であったり、複数のタンパク質がダイナミックに離合・集散するために、困難が予想される。そこで、計画研究では、実績・経験がある方法論の専門家でもある研究者を、また、総括班の連携研究者（評価者）にも手法のシニアな研究者を配した。一方、生物学の様々な先端領域において、細胞シグナリング複合体の構造研究を展開するために、公募研究では、構造生物学的な展開を目指す分子生物学、細胞生物学、生化学、植物学、分子医学等の研究者の提案を取り入れた。そこで、計画研究と公募研究との連携のもとに、上記の研究項目A01, 02, 03を**縦糸**とするのに対して、構造生物学の基盤技術や手法（X線結晶構造解析、シンクロトロン放射光、電顕、NMR、物性・相互作用解析、タンパク質工学・組み替えタンパク質生成技術等）の連携や共有を**横糸**として研究を推進する体制とする。

人材育成では、計画研究の代表者に若手を起用するとともに、公募研究でも若手研究者が参画できるように配慮して、この第三の波のなかで、将来の構造生物学に繋がる潮流を形成することを期している。第四の波の担い手に成長することを視野に入れて、若手には、「**チャレンジングな研究テーマ**」にも挑戦することを奨励する。

以上、本領域の研究を通して、三次元の分子構造に立脚した細胞生物学や分子医学・植

物学等の生命科学全般の水準を世界トップレベルへと底上げして，新しい構造生物学への道を切り開く．

4. 研究の進展状況

研究項目A01 細胞内シグナルの検知と伝達の構造生物学

計画研究では、動物細胞での運動制御タンパク質や力学センサー関連タンパク質、あるいは植物ホルモンのシグナリングタンパク質の構造解析は順調に進んでおり、予定の7-8割程度の構造解析が修了しており、機能解析に力を注いでいる（箱嶋）。また、小胞輸送関連では、膜タンパク質RabGDPの結晶化、タンパク質の膜埋め込みを触媒するGET複合体や膜融合を制御するExocyst複合体、シナプス形成複合体等に取り組んでおり、試料調製が進むとともに、幾つかの解析が終了した（深井）。電顕による単粒子解析では複数の共同研究が進んでおり、イオンチャネルや巨大な酸化ストレスセンサーKeep1や微小管構造変化の解析等で成果が得られており、また、独自のASEM（大気圧走査電子顕微鏡）を用いた結晶化への応用も進んだ。（佐藤主税）。

この研究項目では、18の課題の公募研究が採択されており、GTPase、細胞内輸送、ストレスセンサー、ヘムシグナリング、神経科学関連等の幅広いシグナル伝達経路での複合体が俎上に載った。計画班員との共同研究も含んだ構造解析が進展している。これらの中には有望な複合体結晶がいくつも得られており、今後の展開に期待がもてる。また、公募研究（枯草菌ストレスシグナリング、熊坂）と計画研究（植物ホルモンシグナリング、箱嶋）とで、構造的に相同のタンパク質が鍵となっている等の意外な発見もあり、連携して研究を進めることとした。

研究項目A02 核内シグナルの認識と応答の構造生物学

計画研究では、転写・複製に関わるヒストンシャペロンの研究を推進しており、CIA/ASF1とプロモドメイン複合体構造等の構造決定と機能解析が進み、複製フォークとの関係が理解できつつある（千田）。また、高分子量型ヒストンシャペロンであるHIRAやCAF-1、転写一般に関わるTFIID複合体等の調製の検討が進み、構造研究への移行する試料もでてきた。RNA関連では、tRNA/exportin-5/RanGTPの三者複合体の調製が可能となり、tRNAの核外輸送に関する新知見へ繋がる構造研究への試みが可能となった（山下）。方法論としては、高速高精度の試料回転装置の設置等により、放射光ビームラインBL44XUのマイクロビーム化に対応した測定系の構築に成功した（山下、後述）。

8課題の公募研究では、mRNAプロセッシング、microRNA、RNAアプタマー、あるいは染色体関連等の課題の研究が加わり、生物学的現象の幅が広がった。これらは、独自な系を発展させてきた研究が多いが、国際的な厳しい競争下にある課題も幾つか有る。そのような状況下で、CEMP関連の構造研究がCell等に掲載されたのは朗報である（西野）。

研究項目A03 医学上重要な分子複合体研究の構造生物学

計画研究では、生体防御に関わる受容体のシグナル検知機構（前仲）とチロシンキナーゼ下の増殖系シグナルの抑制因子タンパク質の制御機構（稲垣）解明を推進しており、前者では、麻疹ウイルス感染時のウイルスタンパク質とその受容体との複合体構造により、特異性を決定できた。後者では、一群のチロシンキナーゼのユビキチン化を制御するCBLや、オートファジーAtg7の活性化機構が構造レベルで解明された。また、タンパク質試料発現系や膜タンパク質可溶化の新技术導入等で、多くの班員と連携して本領域の研究活性化に寄与している。また、ピロリ菌感染による発がんタンパク質CagAの構造決定の成果があった（千田）。

公募研究は11課題が採択されており、ユビキチン-プロテアソーム系、炎症サイトカイン、毒素タンパク質の他、自然免疫のTol-like受容体（TLR）や26Sプロテアソーム等巨大複合体等のチャレンジングな研究も含まれる。赤痢菌エフェクタータンパク質Osp1の構造解析は、生化学的解析とともに、これがE2の脱アミド化酵素である証明として、Natureに掲載された

(水島) .

5. 研究を推進する上での問題点と今後の対応策

蛋白質構造研究における律速段階は、高品位（高純度で安定な）のタンパク質試料の大量調製、結晶化、そして十分な分解能のデータ収集である。巨大分子の場合には、これに位相決定や精密化もこれに加わる。各段階での困難を克服するには、専門的な知識や経験が必要である。本新学術領域では、日々の実験で遭遇するこれらの技術的な困難について、適切なアドバイスや問題解決のヒントを提供できるように、各方法論のシニアな研究者が計画研究（研究評価者も含めて）におり、また、公募研究としても特殊な技術に関する専門家（例えば、ストップドフローや流体力学的なタンパク質物性解析）が加わっているので、実験上の大抵の問題に対しては誰かがアドバイスできるようになっている。公募研究によって生物学的な守備範囲が広がって、結晶化や構造解析技術以外の、より生物学的な技術や手法に関するアドバイス等も得られるようになっており、良い「研究コミュニティ」になりつつある。

本学術領域研究の班員以外の研究者からも「班友」のような形でも参加したいという要望を少なからず聞いており、タンパク質構造研究の技術的サポートのニーズの高さを痛感すると共に、情報交換のための交流の場としての新学術領域の位置づけや援助があってもいいと思う。この背景には、構造解析を専門とする伝統的な構造学以外の研究室や研究グループの構造研究への関心の高さや、参入（非専門の研究室が主体となる共同研究）があると思う。旅費等の予算措置可能な「班友」が制度としてあってもいいかもしれない。

5年間の研究領域の助成が予定してあるので、若手あるいは中堅の研究者には、**チャレンジングで大きな研究**をするように奨励している。この点に関しては、「ambitious」な研究者が本領域には揃っており、大きな vision で high impact な結果を狙っている研究者が多いので、頼もしい。特に「チャレンジングな研究」課題、例えば、Exocyt 複合体（深井）や TFIID 複合体（千田）や CENP 複合体（西野）等では、安定なコアとなる複合体の単離と構造解析にも焦点を当てて、完全なホロ複合体の構造解析に繋げる戦略が有効であると考えているが、新学術領域で「**研究戦略の討論**」をもっと活発にしても有意義かも知れない。

「チャレンジングな研究」は、当然、国際的競争のレベルも高くなる。研究の世界においても「**high risk – high return**」であることに違いはない。例えば、TA タンパク質を小胞膜に埋め込む Get 複合体はタンパク質のターゲティングの理解にとって極めて重要であり、厳しい競争下にあった。昨年の初旬に深井等は Get3-Get1 の構造決定に成功しており、本領域での最初の *Nature* 論文になると思われたが、8月に、米国とドイツのグループに *Nature* と *Science* にスクープされてしまった。若手・中堅の構造生物学者の実力は国際レベルに達しているので、最後の一押しで「勝ち・負け」が決まるような気がする。競合になってしまう研究課題は、情報戦のところもあるので、国際的なコミュニティとのつながりを強化することも、一つの方策ではないかと思っている。internet の時代で、国際的に誰とでも access し易い時代なので、国際学会等への参加等で構築する connection だけでなく、e-mail での研究や論文等に関するやりとりも、臆することなく、日常的に、海外の研究者との意見交換や情報交換をすることを若い人に定着させたい。

研究に直結した領域としての問題点ではないが、公開シンポジウムを学会でのシンポジウム等の一つとして、共催というかたちで行ってきたが、このような共催を好まない学会が出てきたことは、新学術の運営としては問題である。学会とは独立で、複数の新学術領域が公開シンポジウムを共催するのもおもしろいかも知れない。

6. 主な研究成果（発明及び特許を含む）

研究項目A01 細胞内シグナルの検知と伝達の構造生物学

計画研究 1 動物・植物細胞のシグナル検知と伝達の構造生物学（箱嶋他 3 名）では、構造解析は予定以上に進んでいる。動物細胞に特徴的な運動制御のシグナリング研究では、細胞骨格系を制御する低分子量GTPaseのRacの重要なGEFタンパク質Tiam1の新規な膜・膜タンパク質相互作用ドメインであるPHCCExドメインの構造を解明するとともに、膜リン脂質やCD44, Ephrin, PAR3等の認識部位を同定した（*EMBO J*, 2010）。また、神経細胞の成長円錐等で糸状仮足の発達に必須であり、運動の方向決定に関与するmyosin-Xについては、積荷認識のMyTH4-FERMドメイン）と積荷の一つであるDCC（axon guidance cueの一つであるnetrinの受容体）との複合体構造を決定して、認識機構を明らかにした（図1, *EMBO J*, 2011：下記7.(1)の主な論文等一覧の論文番号18）。また、myosin-Xのもうひとつの重要な相互作用タンパク質である微小管やintergrinの結合部位を同定するとともに、それらの結合が互いに競合することを初めて明らかにした。

その他、三量体GTPase（Gq）とそれに特異的な薬剤の構造を明らかにした（*PNAS*, 2010：論文31）が、これは薬物の結合した三量体GTPaseの世界初の構造である。

動物細胞の（力学）メカノセンサーの研究では、接着結合（adherens junction, AJ）で張力センサーとして働く α -cateninのvinculinとの複合体と、張力のない自己阻害状態の α -cateninの構造決定に成功しており、細胞レベルでの解析やAFMを使った張力測定の共同研究の結果と合わせて、張力依存的な α -cateninのvinculinへの結合の全貌が世界に先駆けて明らかになりつつある（投稿準備中）。

植物シグナリング研究では、ストリゴラクトン受容体候補のD14とストリゴラクトンとの直接の相互作用を定量するとともにその構造を決定して、これが、 α/β -hydrolase superfamilyに属しており、我々が以前に構造決定したジベレリン受容体GID1（*Nature*, 2008）と蓋部分を持つ等の点が類似していることを明らかにした（投稿準備中、図2）。また、karrikinの受容体候補であるD14Lも構造決定した。また、高親和性アブシジン酸受容体（PYL9）の構造を世界に先駆けて構造決定して、高親和性の機構を解明した（投稿中）。更に、植物特有の転写制御の負因子のファミリーであるGRASドメインタンパク質の構造決定の成功しており、構造に基づいた機能解析を推進中である。

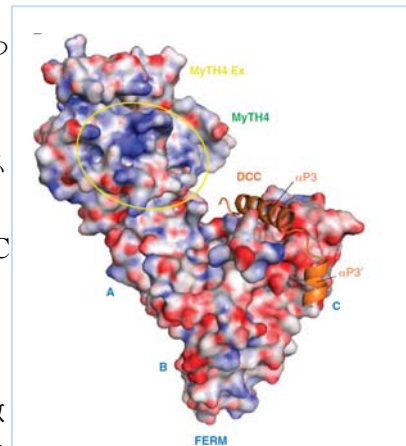


図1. Myosin-X積荷認識ドメインとDCCの複合体。微小管結合部位（黄色サークル）

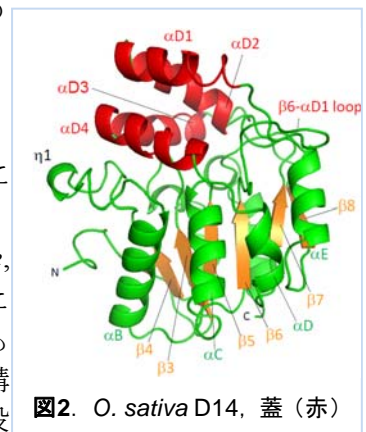


図2. *O. sativa* D14, 蓋（赤）

計画研究 2：小胞輸送の制御に関わる分子複合体群のX線結晶構造解析（深井他 3 名）では、Rab GTPaseの細胞内局在を制御する膜タンパク質GDFの結晶化に挑戦している。得られている結晶の分解能が十分ではない（図3, 8Å）ので、結晶性向上させるために、モノクローナル抗体（mAb）の調製と基質であるRab GTPaseの調製をした。

SNAREタンパク質等を小胞体膜に挿入するGET複合体では、Get3



図3. GDF結晶

ATPaseとGet1受容体の細胞質領域との複合体の結晶構造を決定して、変異実験による相互作用解析やATPaseアッセイを行い、Get1受容体がGet3二量体を開状態に安定化することを明らかにした(図4, *JMB* 2012, in press). 残念ながら米国とドイツのグループに先を越されたが(*Nature*と*Science* 2012), 基質タンパク質との複合体は未だ得られていないので、トップを目指して結晶化を続けている.

膜融合の特異性と高効率性を保証するExocyst複合体では、Sec6サブユニットのホモログで、免疫細胞のtunneling nanotube (TNT) 形成に関わるMsecの結晶構造を3.4 Å分解能で決定して、*in vitro*での脂質との結合と*in vivo*でのTNT形成を解析して、N末端の70残基がイノシトールリン脂質への結合やTNT形成と突起部位への局在に必要であることを明らかにした(図5, 論文準備中). チャレンジングな研究課題として、Exocystのホロ複合体を進めており、全8サブユニットを昆虫細胞で共発現可能な発現ベクターを作成した.

更に、複合体構造決定によるHOIL1による直鎖ユビキチンの認識機構の解明(図6, *PNAS*, 2012: 論文28)で成果を上げるとともに、タンパク質の膜透過複合体SecDF(*Nature*, 2011: 論文4)の構造決定に貢献した. また、植村・東大医(A03)等とシナプス形成複合体等のチャレンジングなテーマにも取り組み、構造解析が進んでいる.



図4. Get3とGet1の細胞質領域との複合体の結晶構造



図5. Msec (Sec6ホモログ)の結晶構造

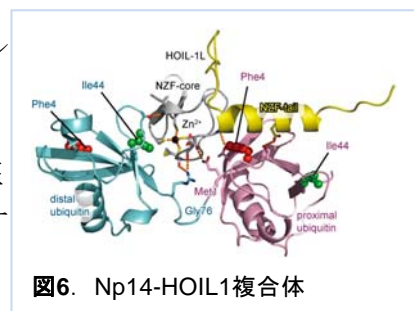


図6. Np14-HOIL1複合体

計画研究3 シグナル制御複合体の構造と細胞内局在の

電子顕微鏡解析(佐藤他3名)では、単粒子構造解析法を高分解能化に取り組んでおり、初期構造を種にして自動的に粒子画像を拾い上げるプログラムの作製を行なった(投稿中). このような手法の改良とともに、6回膜貫通型イオンチャンネルNaChBacの4量体化の責任配列を決定(*Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2010)するとともに、現在その構造解析結果を投稿準備中である. また、細胞内膜系イオンチャンネルMg23を構造決定して準安定状態を複数持つこと等を明らかにした(図7, *Biochemistry* 2011). また、巨大な酸化ストレスセンサーKeep1(黒川・東北大医 A01との共同研究)や微小管構造変化の電子顕微鏡による構造等で成果がでている.

更に、GTP,GDP変換による微小管構造の変化の電子顕微鏡での解析で成果があった(*J. Cell Biol.* 2012: 論文34).

独自のASEM(大気圧走査電子顕微鏡)を用いた細胞微細構造観察や結晶化への応用も複数の共同研究が進んでおり、微小結晶の観察では、「 μm 」の結晶が観察できることが分かった(図8). 結晶化スクリーニングへの応用や、結晶成長過程の観察で、結晶化理論や結晶性の制御への応用の可能性が広がった.

公募研究、計画研究との共同研究等

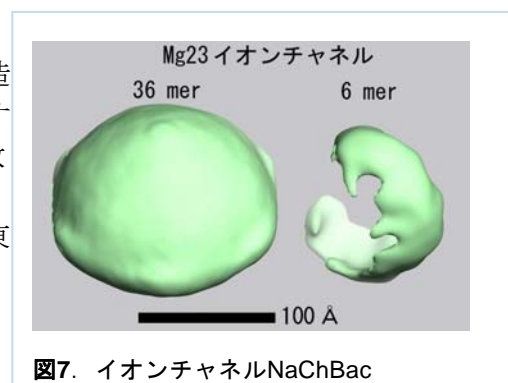


図7. イオンチャンネルNaChBac

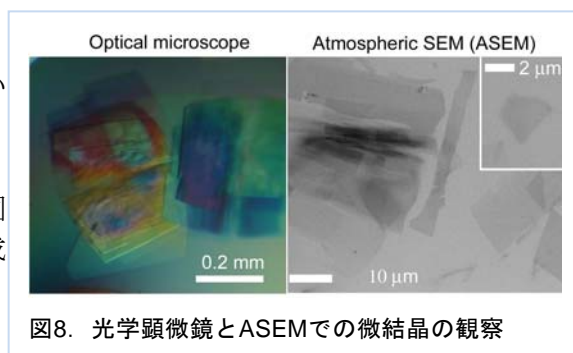


図8. 光学顕微鏡とASEMでの微結晶の観察

GTPase関連では、諸種のGTP結合待機型の新奇な低分子量GTPase群に関わる機能解析が進んでおり、出生後の神経組織に特異的に発現するDi-Rasは、smg-GDSによって制御されるとともに、RapのGEFとして先に同定されたEpac2aのRAドメインに結合して細胞膜にEpac2aを局在化させることが明らかになってきており、これらの複合体の構造解析の領域内での共同研究に向けて、試料調製の準備中にある（堅田・東大薬）。三量体GTPaseのG α サブユニットのGEFはGPCRであるいが、その機構はよく解っていない。一方、細胞質に存在するRic-8もG α サブユニットのGEFとして働くことがわかっている。神経前駆細胞の分化に伴うRic-8A/8Bの発現変化と局在化、さらに細胞遊走における関与等の機能解析が進んでいる（伊東・奈良先端）。計画研究とのRic-8-G α 複合体の構造解析のプロジェクトが進行中である（箱嶋）。

ヘムシグナリングでは、RNA結合活性を持つ鉄代謝制御蛋白質であるIron Regulatory Protein (IRP) のヘム結合の機構やRNA結合活性との関係を分光学的な手法で解析している（石森・北大理）（*PNAS*, 2011: 論文29）。また、病原菌（ジフテリア）でヘム鉄を感知する二成分情報伝達系複合体（膜センサータンパク質ChrS/レギュレータChrA）や、ヘムトランスポータの結晶化を推進しており、幾つかの結晶を得ている。また、グラム陰性菌のヘムトランスポーターシステムのヘム結合ペリプラズムタンパク質 (HemPP)の結晶構造を決定して、ヘム2分子を運搬することを明らかにした（図9, 杉本・理研）。また、NO還元酵素の構造を決定した（*Nature Struct Mol Biol*, 2011: 論文6）。

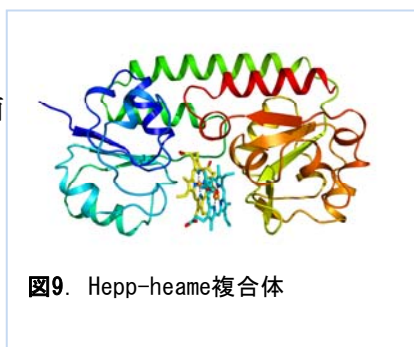


図9. Hepp-heame複合体

ストレスセンサーのシグナル検知については、動物細胞の酸化ストレスセンサーKeap1の研究では、ユビキチンリガーゼ (E3酵素) 複合体(Keap1-Cul3-Roc1)や、選択的オートファジー基質複合体(Keap1-p62-LC3)について構造解析が進行中である（黒河・筑波大医）。これらの解析は、計画研究の佐藤との共同研究である電顕による単粒子解析の結果と合わせて、インパクトの高い成果が望める、興味深い展開となっている。

また、枯細菌のストレスシグナリングでは、RsbQが、植物のD14と近い α/β -hydrolase superfamilyに属しており、その基質は未知であるが、C2-C4程度の脂肪酸に相当するらしいことや活性部位への経路が明らかになってきた（図10, 熊坂・高輝度光科学研）。また、RsbQと相互作用すると考えられているRsbP等の構造解析も進んでいる。これらの研究成果は植物の経路の理解の参考になるので、植物のストリゴラクトンのシグナリング研究（箱嶋）とは、密に連携して研究を進めていくこととなった。

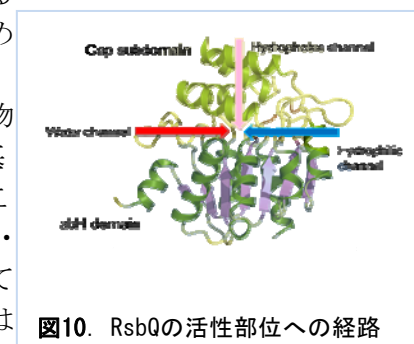


図10. RsbQの活性部位への経路

生化学領域では、植物等の光強度に依存してカルビンサイクルを調節するタンパク質 CP12 との複合体であるCP12-GADPH, CP12-GAPDH-PRK, ならびに PRK の構造解析で成果があった（松村・阪大工）。ここでは、CP12は酸化されてジスルフィド結合を形成してNADとも結合しておりGAPDHの基質結合部位をふさぐことにより、GAPDH活性の阻害メカニズムが示された（図11, *Structure* 2011: 論文21）。また、方法論では、ハイドロゲル中で成長させたタンパク質結晶が浸透圧ショックに安定であることを示して、結晶ハンドリングに応用の道を開いた（*JACS*, 2011: 論文39）。

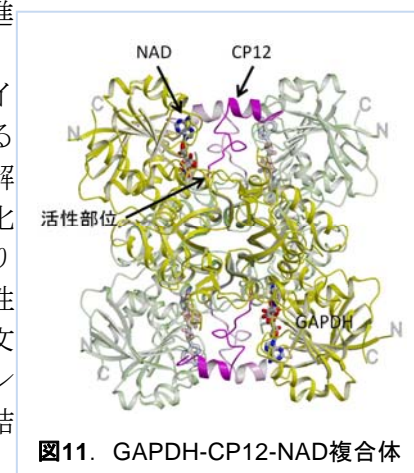


図11. GAPDH-CP12-NAD複合体

研究項目 A02 核内シグナルの認識と応答の構造生物学

計画研究 4：クロマチンリモデリング制御複合体の構造と機能の解析（千田他 3 名）では、低分子量型ヒストンシャペロンの構造研究では実績があり（*Nature* 2007; *PNAS* 2010 等）、これを更に発展させて、より複雑な複合体の構造研究を進めている。低分子量型ヒストンシャペロン **CIA/ASF1** とヒストン H3-H4、そして DNA 複製例ライセンス因子 Mcm2 の 4 者複合体（CIA/ASF1-H3-H4-Mcm2 複合体）を調製・精製することに成功して結晶化に供せるようになった。また、低分子量型ヒストンシャペロン **TAF- β** と H3-H4 との複合体の結晶化も進めている。これらについては、予備的な結晶を得ている。更に、相互作用解析の結果、TAF- β -H2A-H2B-H3-H4 複合体が最も安定に存在することもわかり、構造解析の標的となり得ることが判明した。

これらと平行して、「チャレンジングな研究」として高分子量型ヒストンシャペロン、HIRA や CAF-1、更に TFIID の構造研究も進めている。複製非依存的にヌクレオソームを形成する **HIRA**（100kDa）に関しては、電顕による DNA との相互作用の観察（佐藤・産総研 A01 との共同研究）等から、C 末端側ドメインの微小結晶を得た。**CAF-1** では 3 つのサブユニット（p150, p60, p48）のそれぞれの発現・精製とともに、multiBac システムで複合体としての発現実験を試みている。**FACT 複合体**（ヘテロ二量体、約 200kDa）に関しても、変異体等の工夫をすることにより、良好な発現（1L 培養あたり 50mg 以上の発現量）が得られており、結晶化へ移行する段階までセットアップできた。

TFIID では TAP タグを用いた精製系を立ち上げて、電顕で粗精製されたサンプルのチェックをしている。TAF6, TAF7 のドメインは実験が進んでおり、TAF6 のドメインの結晶は得ている。

方法論の開発としては、難結晶化タンパク質の結晶化の改善や結晶化スクリーニングの効率化・迅速化について、共同プロジェクト（箱嶋、佐藤 A01）を進めており、ASEM による微小結晶の観察プロジェクトでは、低分子性の塩の結晶とタンパク質の結晶の見分けが可能になったことがわかった（論文準備中）。

計画研究 5：核輸送関連の核内複合体の構造解析と放射光測定法の改良（山下）では、低分子 RNA (tRNA や miRNA) の核内外への輸送の問題を取り上げている。特に核外輸送の構造研究では国際的なオピニオンリーダー的存在（*Curr. Opin. Struct. Biol.* 2011：論文 23）であり、現在、核輸送担体(Exportin-5)、輸送制御因子(RanGTP)と低分子 RNA (tRNA や miRNA) あるいは低分子 RNA を介して運ばれるタンパク質(eEF1A 等)との複合体の調製を進めている。tRNA の調製では、初期には 1 回の合成で 1mg 程度しか得られていなかったが、本新学術領域内の tRNA 研究等の専門家である沼田・産総研等との情報交換で、大幅に改善して、大量（5～6mg）の調製に成功して、三者複合体（tRNA-exportin-5 -RanGTP）の調製が可能となり、結晶化を試みれるようになった。また、他の種類の tRNA の調製の可能性も検索できる段階に来た。

方法論の開発では、放射光ビームラインのマイクロビーム化に対応した測定系を新たに構築している。X 線ビームや用いる結晶の微小化（数 μm オーダー）には、光学系や結晶を回転する

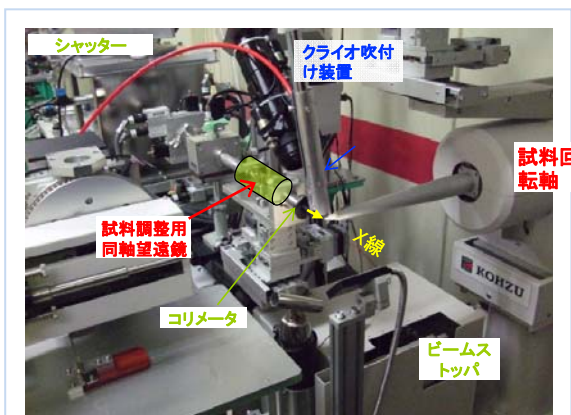
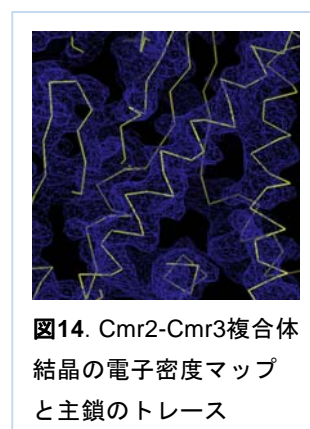
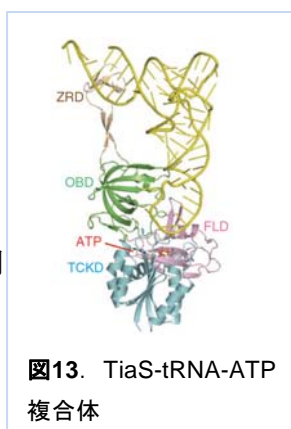


図12. SPring-8 BL44XUのマイクロビームを用いた微小結晶領域からのデータ収集用の高精度高速の試料回転軸の設置

測定機器の高精度化が要求される。そこで、本新学術領域で購入した高精度高速試料回転軸を、SPRING-8の阪大蛋白放射光ビームラインBL44XUに設置した。本新学術領域研究の研究グループのマシントイム中は常時稼働しており、高精度のX線回折実験の推進に大きく寄与している(図12)。性能を示すデータとしては、ファージの細菌への感染時に宿主細胞の膜を突き破るcentral-spike蛋白質の構造解析では、薄い小さな結晶(厚さ20 μm 以下)からのX線回折データで構造解析に成功している。

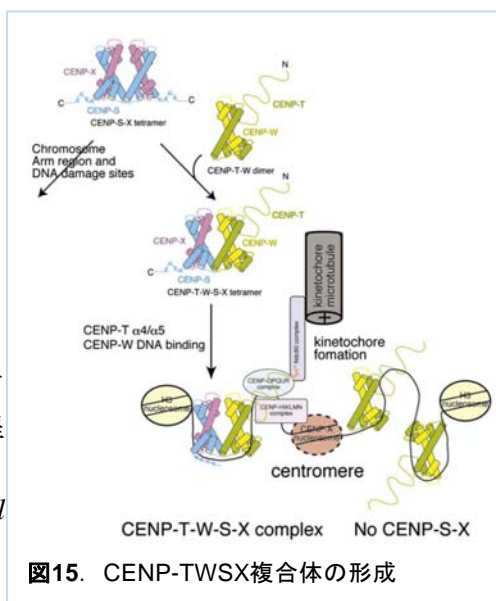
公募研究、計画研究との共同研究等

RNA関連では、tRNAとその修飾酵素(C塩基修飾)の複合体の構造が決定されて、明らかとなった(図13, *Nature Struct Mol Biol* 2011:論文7,8)(沼田・産総研)。また、原核生物が外来核酸から身を守る生体防御機構の一つであるCRISPR(Clustered



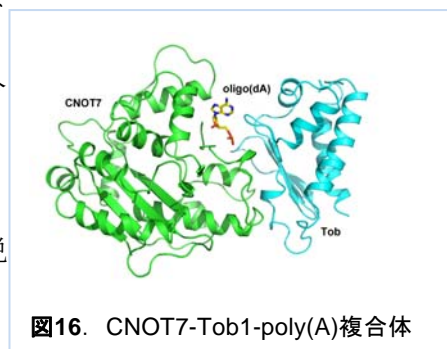
regularly interspaced short palindromic repeats) システムで、細胞内における外来核酸の発現を特異的に抑制するために、外来核酸の配列特異的に分解するエフェクター複合体(microRNAとのリボ核酸複合体)の構造研究を推進している。タイプIIIbのエフェクター複合体(Cmr複合体, 6つのタンパク質サブユニットCmr1-6と1つのcrRNAから構成)のCmr2とCmr3, ならびにCmr4とCmr5とCmr6が相互作用することを見いだしており、Cmr2-Cmr3複合体結晶を得て、構造解析中である(図14)。更に、他のサブユニット複合体や単体の結晶も得ており、平行して、構造解析を進めている。

脊椎動物のキネトコアは100以上の蛋白質因子により構成されているが、そのうちCENP-HI複合体はセントロメアマーカであるCENP-Aのローディング等に関与するキネトコア形成に必須な複合体である。CENP-HIKLMN(HからNの6サブユニットから構成)複合体と相互作用するCENP-Tは、溶液中にて高速AFMを用いて複合体を観察したところ、50nm程の長い天然変性領域と、10nm程の球状ドメインより構成されている事がわかった(西野・遺伝研)(*J. Cell Biol* 2011:論文37)。結晶構造解析の結果、CENP-T, CENP-TW複合体の球状ドメインはヒストンと類似



した構造をもつこと、同様にヒストン様構造ドメインをもつCENP-S, CENP-Xとヘテロテトラマーを形成することがわかった(図15, *Cell* 2012:論文1)。

mRNAプロセッシングの研究では、チロシンキナーゼ下流で増殖刺激等でリン酸化されるアダプターTobと会合するCCR4-NOT複合体の構造解析をすすめて、この複合体の形成や、mRNAの脱アデニル化反応へのTobの関与の仕組みを解析しており(図16, *EMBO J*, 2011:論文17, *Nature Struct Mol Biol*, 2011:論文9)。最近、CNOT7-Tob1-poly(A)複合体構造決定に成功しており、脱アデニル化のためのpoly(A)トラップの詳細が明らかとなった(山本・東大医科研/沖縄大学院)。



研究項目 A03 医学上重要な分子複合体研究の構造生物学

計画研究 6 生体防御に関わる細胞表面受容体のシグナル検知機構の解析（前仲）では、先ず、麻疹ウイルス表面受容体結合蛋白質とヒト免疫系受容体 SLAM との弱い親和性の複合体を一本鎖化や化学修飾、さらに変異導入等、複数の工夫を重ねて結晶化に成功した。この複合体の構造解析から麻疹ウイルスの免疫細胞への侵入／融合システムについて新たなモデルを提唱して、麻疹ウイルスワクチンの有効性を明らかにした（図 16, *Nature Struct Mol Biol*, 2011 : 論文 10）。

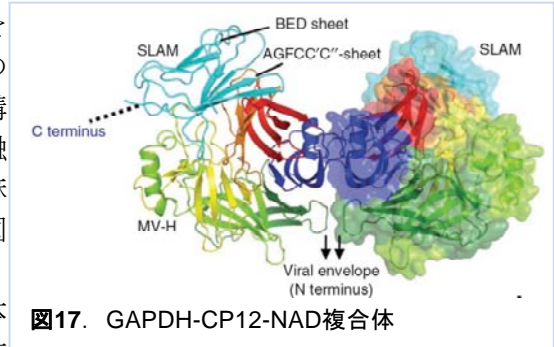


図17. GAPDH-CP12-NAD複合体

ヒト Th17 細胞に高発現する免疫系受容体 NKR-P1(CD161)については、リガンド LLT との結合様式を相互作用解析と幅広い変異体解析から複合体モデル構築に成功した（図 18）。NKR-P1 受容体と LLT1 はいずれもレクチン様細胞表面受容体(KLR)に属するが、KLR ファミリー同士の複合体の結合モデルの構築はこれまでになく、他の KLR ファミリーのリガンド認識の雛形となる成果である。これにより、NKR-P1 による Th17 細胞などの制御機構についてその分子基盤が明らかとなり、今後の人為的免疫制御への応用が期待できる。

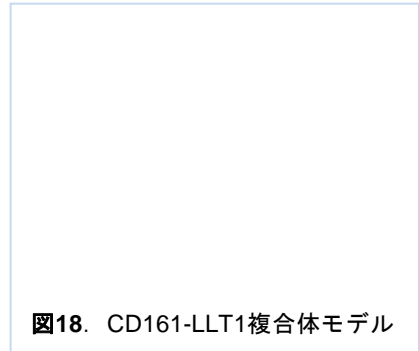


図18. CD161-LLT1複合体モデル

計画研究 7 シグナル抑制因子 CBL の分子複合体構造と病変変異の解析（稲垣）では、チロシンキナーゼ下の CBL (c-Cbl, Cbl-b and Cbl3)は、受容体チロシンキナーゼ (EGFR, c-KIT, PDGFR など)、非受容体型チロシンキナーゼ (Src family kinase, Syk, Zap-70 など)のユビキチン化を触媒することにより細胞内シグナル伝達の抑制因子として機能する。Cbl-b は Y363 のリン酸化により活性化されることで E3 として機能する。NMR による詳細な解析から、Cbl-b のリン酸化による制御機構が単なる Open-Close 間の平衡の移動によるものではなく、平衡の移動と E2 との結合により適した結合面の形成の 2 つの機構により制御されていることが明らかとなった（図 19. *PNAS*, 2011 : 論文 27）。

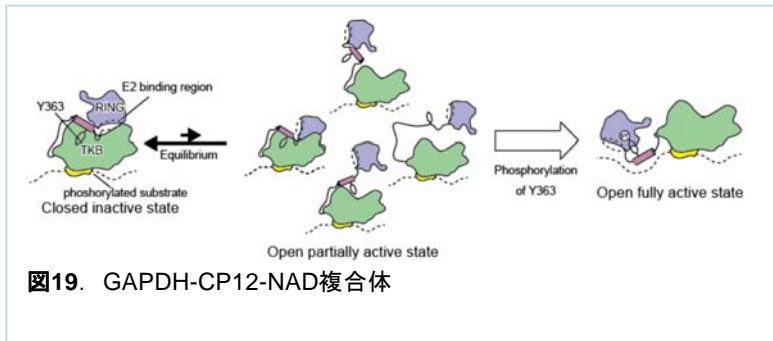


図19. GAPDH-CP12-NAD複合体

また、オートファジータンパク質 Atg の E1 での活性化機構で成果があった。（図 20. *Molecular Cell*, 2011 : 論文 14）。ここでは、オートファジーの進行に必須な Atg8 の活性化は特殊な E1 酵素である Atg7 が行っている。Atg7 と Atg8 との複合体の構造を決定して、Atg7 は一般的な E1 酵素とは顕著に異なる構造をもち、Atg8 を少なくとも二段階のステップで認識して活性化することが明らかとなった。さらに Atg7 は活性化した Atg8 をその特異的 E2 酵素である Atg3 へと受け渡す際、別の Atg7 分子に結合した Atg3 へと Atg8 を受け渡すことを明らかにした。これら

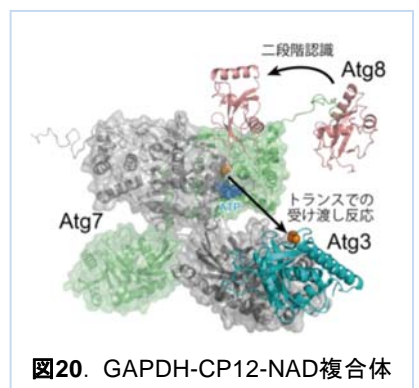


図20. GAPDH-CP12-NAD複合体

は他の E1 酵素とは全く異なる Atg7 固有のメカニズムであり, それを活用したオートファジー特異的な阻害剤の開発が期待できることがわかった。

方法論の開発では, カイコ個体を用いた蛋白質生産系でのタンパク質発現の指導で多くの班員と連携している(前仲)。これまでにDNA直接接種によるカイコ個体蛋白質生産系・糖鎖制御ヒト培養細胞発現系等確立してきたことを踏まえて, さらに対象を広げて細胞表面受容体・ウイルス抗原や抗体等の発現を試みており, 一部は結晶化と構造決定に成功している。一方, 脂質二重膜模倣素子ナノディスクの構造研究や相互作用研究への応用(稲垣)も多くの連携を生んでいる。例えば, 脂質二重膜模倣素子ナノディスクに埋め込んだホスホイノシチド(PtdIns)とエフェクターとの相互作用(深井・東大 A01)を解析した。Tiam1 PHCCExドメインとイノシトールリン酸PtdIns(4,5)P₂を埋め込んだナノディスクとの相互作用解析(三島・首都大東京 A01)等である。

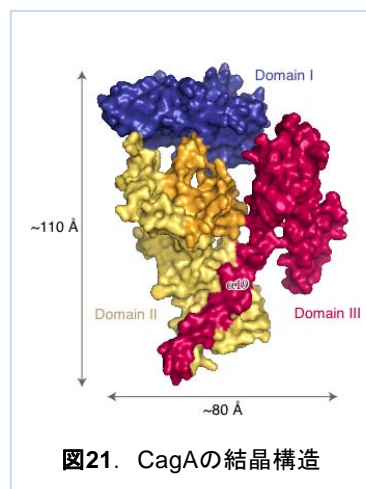


図21. CagAの結晶構造

ヘリコバクターピロリ菌CagAタンパク質は, 感染時に宿主細胞に注入されて, その細胞内シグナル伝達経路をかく乱する発がんタンパク質であることが東大医・畠山等によって明らかにされている。この構造決定に千田・産総研等が挑戦して, 最近構造決定に成功した(図21, *Cell Host Microbe*, 2011: 論文15)。この構造に基づいて, CagAのN-末端内にあるNBS配列とC-末端側にあるCBS配列の相互作用に依存して, 細胞内のシグナルを攪乱するCagA-PAR1(リン酸化酵素)-SHP2(脱リン酸化酵素)複合体が逐次的に形成されるというモデル提案した。

公募研究, 計画研究との共同研究等

ユビキチン-プロテアソーム系での研究では, 赤痢菌エフェクタータンパク質Osp1の構造決定と生化学的性状の解析により, OspI は炎症シグナル経路の制御に重要なTRAF6の活性化に必要なUbc13 に結合して, 100 番目のグルタミンを脱アミド化する新規な脱アミド化酵素であることを明らかにした(水島・兵庫県立大)

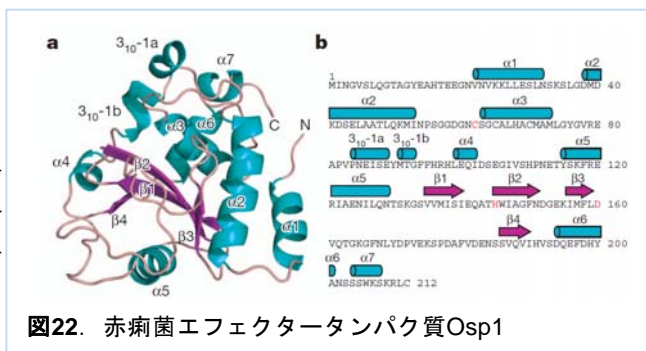


図22. 赤痢菌エフェクタータンパク質Osp1

(図22. *Nature*, 2012: 論文2)。これにより, 感染初期の病原体に対する粘膜上皮の新規な防御機構と, それに対抗する病原体側のあらたな戦術が解明されたが, 更に両者の複合体の構造決定にも成功しており, 続報を準備中である。また, 26Sプロテアソームという巨大複合体等のチャレンジングな研究にも挑戦している。

自然免疫のTol-like受容体 (TLR) では, グラム陰性細菌の外膜構成成分であるlipopolysaccharide (LPS)のTLR4/MD-2による認識機構で成果が上がっている(図23 *PNAS* 2012: 論文25, *Cell Metabol*, 2011: 論文16, 大戸・東大薬)。TLR研究は国際競争が激烈であるが, 新しいTLRの調製や結晶化に鋭意取り組んでおり, 最近進展があったので高インパクトの成果が楽しみである。

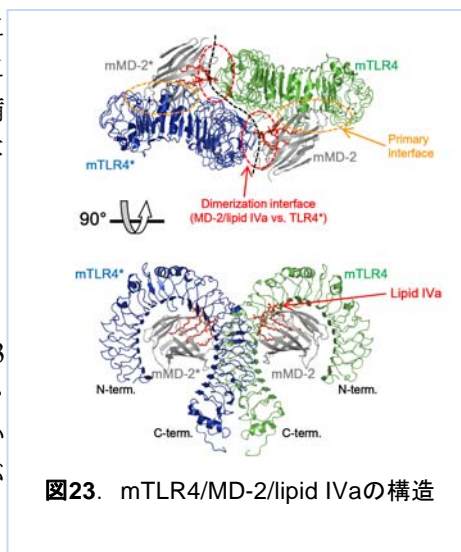


図23. mTLR4/MD-2/lipid IVaの構造

まとめ

以上、研究項目毎に主な成果を紹介してきたが、全体としては、構造解析は予定以上に進んでおり、また、公募と計画班員との共同研究も進展している。更に、有望な複合体結晶がいくつも得られており、これらの中には構造解析がかなり進んでいる結晶も幾つかある。残念ながら、特に厳しい競争・競合下にある高インパクトの研究については、本報告書に「あからさま」には書けなかったが、いずれにせよ、今後の展開に大いに期待がもてる状態になっていると思う。

新学術領域研究の目的との関連について

新学術領域研究は、「研究者又は研究者グループにより提案された、我が国の学術水準の向上・強化につながる新たな研究領域について、共同研究や研究人材の育成等の取り組みを通じて発展させる。」（公募要領より）を目的として、研究対象としては、「次のいずれかに該当する新たな研究領域であって、協同して推進する複数の研究者で構成される研究グループの有機的な連携の下に領域の学術水準の向上を図ることにより、革新的・創造的な学術研究の発展が期待できるもの。」とある。

本領域「構造細胞生物学」が採択された以下の3つの類型との関係で、ポイントを要約しておく。

「■(2)異なる学問分野の研究者が連携して行う共同研究等の推進により、当該研究領域の発展を目指すもの。」

5. の項目でも言及したが、蛋白質構造研究における各律速段階での困難を克服するには、専門的な知識や経験・技術が必要である。そこで、計画研究には複合体構造研究で実績ある専門家を配して基盤技術や手法を充実した。一方、公募研究では様々な生物・医学分野の研究者の参画を図り、分子生物学、細胞生物学、生化学、生物工学、医科学等の多くの領域の研究者が参画した。その結果、構造生物学を専門とする計画班員と各生物学領域の研究者との連携の下に、成果を生みつつある。

例えば、共同研究としては、電顕の専門家である佐藤・産総研（A01）と医科学の黒河・東北大医（A01）との酸化ストレスセンサーKeap1の研究や、X線の専門家の深井・東大放射光機構（A01）と神経科学の植村・東大医（A03）とのシナプス形成におけるGluRδ2-Cbln1-NRXN 三者複合体の構造・機能研究であり、大きな成果が上がりつつある。また、X線の専門家の山下・阪大蛋白研（A02）とRNAの専門家の沼田・産総研（A02）との連携では、山下等のtRNA-Importin-5-RanGTPaseの研究が大幅に進展した。

「■(3)多様な研究者による新たな視点や手法による共同研究等の推進により、当該研究領域の新たな展開を目指すもの。」

計画研究の班員を中心とした基盤技術や手法は、多様多彩であり（試料発現・精製では、細菌、ヒト、昆虫等の各種培養細胞や生きたカイコを使ったタンパク質工学・組み替えタンパク質生成技術等、物性・相互作用解析では、光散乱、熱測定、表面プラズモン共鳴ストップドフローや分析超遠心を用いた流体力学的な手法等、構造解析では、X線結晶構造解析、電顕、NMR、シンクロトロン放射光）、およそタンパク質の構造研究に有効なものは全て揃っている。本領域では、各研究課題の研究者が、アドバイスを受けたり、連携や共同で研究が進められる研究コミュニティが形成できている。また、様々な生物学領域からの参画で、生物学からのアドバイス等も有用で功を奏しているケースもある。

このような手法の連携に加えて重要な点は、連携を通して生物現象の考え方が豊かになることである。各分野の専門家の理解の仕方は、得意とする手法に大きく依存する。タンパク質やその機能の理解の仕方も、構造生物学あるいはタンパク質科学の中でも異なるし、これに、分子生物学、細胞生物学、生化学や医科学の専門家が加わると、「証明されたこと」

の共通認識は極めて曖昧になる。本研究領域では、“機能している現場”をシグナリング複合体として捉えることにこだわって研究を展開することで、複雑なシグナル伝達制御でも、分子の実像を思い浮かべながら、分子機構を理解することを共通認識として、構造に基づいた相互作用の記述を共通言語としようとしている。

「■(4)当該領域の研究の発展が他の研究領域の研究の発展に大きな波及効果をもたらすもの。」

特異性の本体が問題となる受容体によるシグナル検知の過程が重要な分野、あるいは、種々の酵素の特異性や活性の制御が問題となる現象には、構複合体造は決定的な解答を提供することになる。このような特殊な系でなくても、シグナル伝達や応答を制御する「on-off」のスイッチの動作を分子構造として理解して、定量的な特性をメカニズムとともに記述することはサイエンスとして極めて重要である。「on-off」と言っても、分子レベルでは「all-or-non」的な変換は実際には少なく、線形であったり、協同性の強い sigmoid であったり、あるいは非線形であったり、複数の因子が独立であったり、加算的であったりする。このような相互作用の特性は構造無しで十分な理解は難しい。構造に関する知識は、制御系の定量的で機械論的な理解や定式化には必要不可欠である。例えば、最近、細胞の力学センサーの研究で、力学センサータンパク質 (α E-catenin) の張力応答曲線を AFM で実験的に求めたが、構造モデルの知識がない状態での解釈はほとんど不可能であった。このような、比較的単純な系であっても、構造がないと、現象の正確な理解はできない。

今後、生物研究の主流が、更に精密な解析、例えば、制御回路をシュミレーションしながら、細胞組織・器官あるいは個体の応答・動作等の動態を理解しようとするレベルに到達した時には、素過程が分子構造レベルでわかっているか、わかっていないかが決定的に重要になる。全て「all-or-non」的なスイッチ機構で組んだシュミレーションは上手くないことが既にわかっている。各ステップのスイッチがもつ特性を反映させる必要がある。

構造に関する詳細な情報は、例えば、薬物設計等で有用であることはよく理解されており、ゲノム創薬の時代の基礎をなしている。しかし、もっと一般的に、構造の知識は、複雑な生物を解析する「新しい道具」の開発を促進するという意味でもっと重要であると考えている。生物の研究対象として扱う系がどんどん複雑になれば、それなりの道具が必要である。現在、GFP を使ったイメージングは必要不可欠な道具となっているが、そのような新しいタンパク質分子、例えば、最近、良く言われているのは細胞間の負荷力の可視的なレポータータンパク質（形態形成の解析に有用）、が生まれる苗床になれば、波及効果は計り知れない。

7. 研究成果公表の状況（主な論文等一覧、ホームページ、公開発表等）

(1) 主な論文等一覧

英文の原著論文（査読付き）が202報，和文（総説等）が26報で，合計 228報の論文を発表した（2012年5月現在）．主な論文一覧を以下に記すとともに，代表的な論文の初頁コピーを添付する．

I) 構造生物学関連

- 1) CENP-T-W-S-X forms a unique centromeric chromatin structure with a Histone-like fold. Nishino T, Takeuchi K, Gascoigne KE, Suzuki A, Hori T, Oyama T, Morikawa K, Cheeseman IM, *Fukagawa T.
Cell **148**, 487-501 (2012).
- 2) The *Shigella flexneri* effector OspI deamidates UBC13 to dampen the inflammatory response. Sanada T, Kim M, Mimuro H, Suzuki M, Ogawa M, Oyama A, Ashida H, Kobayashi T, Koyama T, Nagai S, Shibata Y, Gohda J, Inoue J,* Mizushima T, *Sasakawa C.
(double corresponding authors)
Nature **483**, 623-626 (2012).
- 3) Crystal structure of an orthologue of the NaChBac voltage-gated sodium channel
Zhang X, Ren W, DeCaen P, Yan C, Tao X, Tang L, JWang J, Hasegawa K, Kumasaka T, He J, Wang J, Clapham DE & *Yan N
Nature **486**, 130-135 (2012).
- 4) Structure and function of a membrane component SecDF that enhances protein export.
Tsukazaki T, Mori H, Echizen Y, Ishitani R, Fukai S, Tanaka T, Perederina A, Vassilyev DG, Kohno T, Maturana AD, Ito K, *Nureki O.
Nature **474**, 235-238 (2011).
- 5) Rotational movement of the formin mDia1 along the double helical strand of an actin filament.
Mizuno H, Higashida C, Yuan Y, Ishizaki T, Narumiya S, *Watanabe N.
Science **331**, 80-83 (2011).
- 6) Crystal structure of quinol-dependent nitric oxide reductase from *Geobacillus stearothermophilus*.
Matsumoto, Y., Tosha, T., Pislakov, A. V., Hino, T., Sugimoto, H., Nagano, S., Sugita, Y., *Shiro, Y.
Nature Struct. Mol. Biol. **19**, 238-245 (2012)
- 7) Structural basis of tRNA agmatinylation essential for AUA codon decoding.
Osawa T, Kimura S, Terasaka N, Inanaga H, Suzuki T, *Numata, T.
Nature Struct. Mol. Biol. **18**, 1275-1280 (2011).
- 8) Biogenesis of 2-agmatinylcytidine catalyzed by the dual protein and RNA kinase TiaS. Terasaka N, Kimura S, Osawa T, Numata T, *Suzuki T.
Nature Struct. Mol. Biol. **18**, 1268-1274 (2011).
- 9) miRNA-mediated deadenylation is orchestrated by GW182 through two conserved motifs that interact with CCR4-NOT.
Fabian MR, Cieplak MK, Frank F, Morita M, Green J, Srikumar T, Nagar B, Yamamoto T, Raught B, Duchaine TF and *Sonenberg N,
Nature Struct Mol. Biol. **18**, 1211-1217 (2011)
- 10) Structure of the measles virus hemagglutinin bound to its cellular receptor SLAM. Hashiguchi T, Ose T, Kubota M, Maita N, Kamishikiryo J, *Maenaka K, *Yanagi Y. (double corresponding

authors)

Nature Struct. Mol. Biol. **18**, 135-141 (2011).

- 11) An energy transduction mechanism used in bacterial flagellar type III protein export. Minamino T, Morimoto YV, Hara N, *Namba K.
Nature Commun. **2**, 475 (2011).
- 12) A role for mDia, a Rho-regulated actin nucleator, in tangential migration of interneuron precursors. Shinohara R, Thumkeo D, Kamijo H, Kaneko N, Sawamoto K, Watanabe K, Takebayashi H, Kiyonari H, Ishizaki T, Furuyashiki T, *Narumiya S.
Nature Neurosci. **15**, 373-380 (2012).
- 13) NMR protein structure determination in living E. coli cells using nonlinear sampling . Ikeya, T., Sasaki, A., Sakakibara, D., Shigemitsu, Y., Hamatsu, J., Hanashima, T., Mishima, M., Yoshimasu, M., Hayashi, N., Mikawa, T., Nietlispach, D., Wälchli, M., Smith, B.O. Shirakawa, D., Güntert, P., *Ito. Y.
Nature Protoc. **5**, 1051-1060 (2010).
- 14) Structural basis of Atg8 activation by a homo-dimeric E1, Atg7. Nobuo N. Noda, Kenji Satoo, Yuko Fujioka, Hiroyuki Kumeta, Kenji Ogura, Hitoshi Nakatogawa, Ohsumi, Y. and *Inagaki, F.
Molecular Cell **44**, 462-475 (2011).
- 15) Tertiary structure and functional analysis of the Helicobacter pylori CagA oncoprotein. Hayashi, T., Senda, M., Morohashi, H., Higashi, H., Horio, M., Nagase, L., Sasaya, D., Shimizu, T, Venugopalan, N., Kumeta, H., Noda, N. N., Inagaki, F., *Senda, T. and *Hatakeyama, M.
(double corresponding authors)
Cell Host Microbe, in press (2012).
- 16) Saturated Fatty Acid and TLR Signaling Link β Cell Dysfunction and Islet Inflammation. Eguchi, K., *Manabe, I., Oishi-Tanaka, Y., Ohsugi, M., Kono, N., Ogata, F., Yagi, N., Ohto, U., Kimoto, M., Miyake, K., Tobe, K., Arai, H., Kadowaki, T., & *Nagai, R.
Cell Metab. **15**, 1-16. (2012)
- 17) Obesity resistance and increased hepatic expression of catabolism-related mRNAs in Cnot3^{+/-} mice. Morita M, Oike Y, Nagashima T, Kadomatsu T, Tabata M, Suzuki T, Nakamura T, Yoshida N, Okada M, and *Yamamoto T,
EMBO J. **30**, 4678-4691 (2011)
- 18) Structural basis of cargo recognition by the myosin-X MyTH4-FERM domain. Hirano Y, Hatano T, Takahashi A, Toriyama M, Inagaki N, *Hakoshima T.
EMBO J. **30**, 2734-2747 (2011).
- 19) Non-canonical UBA-UBL interaction mediates formation of linear ubiquitin chain assembly complex. Yagi, H., Ishimoto, K., Hiromoto, T., Fujita, H., Mizushima, T., Uekusa, Y., Yagi-Utsumi, M., Kurimoto, E., Noda, M., Uchiyama, S., Tokunaga, F., Iwai, K., and *Kato, K.
EMBO rep. in press (2012).
- 20) Mechanistic insights into the activation of rad51-mediated strand exchange from the structure of a recombination activator, the swi5-sfr1 complex. Kuwabara N, Murayama Y, Hashimoto H, Kokabu Y, Ikeguchi M, Sato M, Mayanagi K, Tsutsui Y, Iwasaki H, *Shimizu T.
Structure (Cell Press) **20**, 440-449. (2012)
- 21) Structure basis for the regulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity. via the

intrinsically disordered protein CP12.

Matsumura H, Kai A, Maeda T, Tamoi M, Satoh A, Tamura H, Hirose M, Ogawa T, Kizu N, Wadano A, *Inoue T, *Shigeoka S. (double corresponding authors)

Structure (Cell Press) **19**, 1846-54 (2011).

- 22) Structural basis for DNA strand separation by the unconventional winged-helix domain of RecQ helicase WRN.

Kitano K, Kim SY, *Hakoshima T.

Structure (Cell Press) **18**, 177-187 (2010).

- 23) Selective nuclear export mechanism of small RNAs.

Lee S. J., Jiko C., Yamashita E., *Tsukihara T.

Curr. Opin. Struc. Biol., **21**, 101-108 (2011)

- 24) Ice-binding site of snow mold fungus antifreeze protein deviates from structural regularity and high conservation.

Kondo, H., Hanada, Y., Sugimoto, H., Hoshino, T., Garnham, C. P., Davies, P. L., *Tsuda, S.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. in press (2012)

- 25) Structural basis of species-specific endotoxin sensing by innate immune receptor TLR4/MD-2

Ohto, U., Fukase, K., Miyake, K., and *Shimizu, T

Proc. Natl. Acad. Sci., USA **109**, 7421-7426 (2012)

- 26) The archaeal ribosomal stalk protein interacts with translation factors in a nucleotide-independent manner via its conserved C-terminus.

Nomura, N., Honda, T., Baba, K., Naganuma, T., Tanzawa, T., Arisaka, F., Noda, M., Uchiyama, S., Tanaka, I., Yao, M., *Uchiumi, T.,

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **109**, 3748-3753 (2012).

- 27) Autoinhibition and phosphorylation-induced activation mechanisms of human cancer and autoimmune disease-related E3 protein Cbl-b. Kobashigawa Y, Tomitaka A, Kumeta H, Noda NN, Yamaguchi M, *Inagaki F.

Proc Natl Acad Sci USA **108**, 20579-84 (2011).

- 28) Specific recognition of linear ubiquitin chains by the Npl4 zinc finger (NZF) domain of the HOIL-1L subunit of the linear ubiquitin chain assembly complex.

Sato, Y., Fujita, H., Yoshikawa, A., Yamashita, M., Yamagata, A., Kaiser, S. E., Iwai, K., *Fukai, S.

Proc Natl Acad Sci USA **108**, 20520-5 (2011).

- 29) NMR basis for interprotein electron transfer gating between cytochrome c and cytochrome c oxidase.

Sakamoto K, Kamiya M, Imai M, Shinzawa-Itoh K, Uchida T, Kawano K, Yoshikawa S, *Ishimori K.

Proc Natl Acad Sci USA **108**, 12271-6 (2011).

- 30) Structural insight into maintenance methylation by mouse DNA methyltransferase 1 (Dnmt1).

Takeshita K., Suetake I., Yamashita E., Suga M., Narita H., Nakagawa A., *Tajima S.

Proc Natl Acad Sci USA **108**, 9055-9059 (2011).

- 31) Structural basis for the specific inhibition of heterotrimeric Gq protein by a small molecule.

Nishimura A, Kitano K, Takasaki J, Taniguchi M, Mizuno N, Tago K, *Hakoshima T, *Itoh H.

(double corresponding authors)

Proc Natl Acad Sci USA **107**, 13666-13671 (2010).

- 32) Structure of the histone chaperone CIA/ASF1-double bromodomain complex linking histone modifications and site-specific histone eviction.

Akai, Y., Adachi, N., Hayashi, Y., Eitoku, M, Sano, N., Natsume, R., Kudo, N., Tanokura, M.,

*Senda, T and *Horikoshi, M. (double corresponding authors)

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **107**, 8153-8158 (2010).

- 33) Bovine cytochrome c oxidase structures enable O₂ reduction with minimization of reactive oxygens and provide a proton-pumping gate.
Muramoto K., Ohta K., Shinzawa-Itho K., Kanada K., Taniguchi M., Nabekura H., Yamashita E., Tsukihara T., *Yoshikawa S.
Proc Natl Acad Sci USA., **107**, 7740-7745 (2010).
- 34) Large Conformational Changes in Tubulin in the GTP- and GDP- States Microtubules Observed by Cryo Electron Microscopy
Yajima, H., Ogura, T., Nitta, R., Okada, Y., Sato, C. and *Hirokawa, N.
J. Cell Biol., in press (2012).
- 35) Crystal structure of the ligand binding domain of $\alpha 5\beta 1$ integrin: Atomic details of the fibronectin receptor.
Nagae, M., Re, S., Mihara, E., Nogi, T., Sugita, Y., *Takagi, J.
J. Cell Biol., **197**, 131-140 (2012).
- 36) Munc13-4 reconstitutes calcium-dependent SNARE-mediated membrane fusion.
Boswell KL, James DJ, Esquibel JM, Bruinsma S, Shirakawa R, Horiuchi H, *Martin TF,
J. Cell. Biol. **197**, 301-312 (2012).
- 37) Spindle microtubules generate tension-dependent changes in the distribution of inner kinetochore proteins.
Suzuki A, Hori T, Nishino T., Usukura J, Miyagi A Morikawa K. and *Fukagawa T.
J. Cell Biol. **193** 125-140 (2011).
- 38) Sorting of GPI-anchored proteins into ER exit sites by p24 proteins is dependent on remodeled GPI.
Fujita M, Watanabe R, Jaensch N, Romanova-Michaelides M, Satoh T, Kato M, Riezman H, Yamaguchi Y, Maeda Y, *Kinoshita T.
J. Cell Biol. **194**, 61-75 (2011).

II) 方法論関連

- 39) Growth of protein crystals in hydrogels prevents osmotic shocks
*S. Sugiyama, M. Maruyama, G. Sazaki, M. Hirose, H. Adachi, K. Takano, S. Murakami, T. Inoue, Y. Mori, and *H. Matsumura
J. Am. Chem. Soc. **134**, 5786-5789 (2012). Selected as a *JACS* Spotlights
- 40) Screw motion regulates multiple functions of T4 phage protein gene product 5 during cell puncturing.
Nishima, W., Kanamaru, S., Arisaka, F. and *Kitao, A
J. Am. Chem. Soc. **133**, 13571-13576 (2011).
- 41) The Atmospheric Scanning Electron Microscope with open sample space observes dynamic phenomena in liquid or gas.
*Suga, M., Nishiyama, H., Konyuba, Y., Iwamatsu, S., Watanabe, Y., Yoshiura, C., Ueda, T. and *Sato, C.
Ultramicroscopy. **111**, 1650-1658 (2011)
- 42) Enantioselectivity of haloalkane dehalogenases and its modulation by surface loop engineering.
P rokop, Z., Sato, Y., Brezovsky, J., Mozga, T., Chaloupkova, R., Koudelakova, T., Jerabek, P., Stepankova, V., Natsume, R., van Leeuwen, J. G. E., Janssen, D. B., Florian, J., Nagata, Y., Senda, T. and *Damborsky, J.

Angew. Chem. Int. **49**, 6111-6115 (2010).

CENP-T-W-S-X Forms a Unique Centromeric Chromatin Structure with a Histone-like Fold

Tatsuya Nishino,¹ Koza Takeuchi,¹ Karen E. Gascoigne,² Aussie Suzuki,¹ Tetsuya Hori,¹ Takuji Oyama,³ Kosuke Morikawa,³ Iain M. Cheeseman,² and Tatsuo Fukagawa^{1,*}

¹Department of Molecular Genetics, National Institute of Genetics and The Graduate University for Advanced Studies (SOKENDAI), Mishima, Shizuoka 411-8540, Japan

²Whitehead Institute for Biomedical Research and Department of Biology, Massachusetts Institute of Technology, Nine Cambridge Center, Cambridge, MA 02142, USA

³Takara-Bio Endowed Division, Department of Biomolecular Recognition, Institute for Protein Research, Osaka University, Suita, Osaka 565-0874, Japan

*Correspondence: tfukagaw@lab.nig.ac.jp

DOI 10.1016/j.cell.2011.11.061

SUMMARY

The multiprotein kinetochore complex must assemble at a specific site on each chromosome to achieve accurate chromosome segregation. Defining the nature of the DNA-protein interactions that specify the position of the kinetochore and provide a scaffold for kinetochore formation remain key goals. Here, we demonstrate that the centromeric histone-fold-containing CENP-T-W and CENP-S-X complexes coassemble to form a stable CENP-T-

with centromeric DNA. Defining the molecular mechanisms by which kinetochore proteins specify the position on the chromosome and generate stable contacts with DNA to drive kinetochore assembly remain key goals. Nucleosomes containing the centromere-specific histone H3 variant CENP-A provide an important mark to establish a centromere-specific chromatin structure (Black and Cleveland, 2011). However, although CENP-A deposition is necessary for kinetochore specification, it is not strictly sufficient for the formation of functional kinetochores in vertebrate cells (Van Hooser et al., 2001; Gascoigne et al., 2011). This suggests that there are additional proteins that are required to generate centromere-specific chromatin

LETTER

doi:10.1038/nature10894

The *Shigella flexneri* effector OspI deamidates UBC13 to dampen the inflammatory response

Takahito Sanada¹, Minsoo Kim¹, Hitomi Mimuro², Masato Suzuki³, Michinaga Ogawa³, Akiho Oyama³, Hiroshi Ashida³, Taira Kobayashi³, Tomohiro Koyama⁴, Shinya Nagai⁴, Yuri Shibata⁵, Jin Gohda⁵, Jun-ichiro Inoue⁵, Tsunehiro Mizushima⁶ & Chihiro Sasakawa^{1,3,4}

Many bacterial pathogens can enter various host cells and then survive intracellularly, transiently evade humoral immunity, and further disseminate to other cells and tissues. When bacteria enter host cells and replicate intracellularly, the host cells sense the invading bacteria as damage-associated molecular patterns (DAMPs) and pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) by way of various pattern recognition receptors. As a result, the host cells induce alarm signals that activate the innate immune system¹. Therefore, bacteria must modulate host inflammatory signalling and dampen these alarm signals²⁻⁴. How pathogens do this after invading epithelial cells remains unclear, however. Here we show that OspI, a *Shigella flexneri* effector encoded by *ORF169b* on the large plasmid and delivered by the type III secretion system, dampens acute inflammatory responses during bacterial invasion by suppressing the tumour-necrosis factor (TNF)-receptor-associated factor 6 (TRAF6)-mediated signalling pathway. OspI is a glutamine deamidase that selectively deamidates the glutamine residue at position 100 in UBC13 to a glutamic acid residue. Consequently, the

We found that the messenger RNA levels of chemokines (for example, interleukin-8 (IL-8), CC-chemokine ligand 20 (CCL20), CXCL2 and CXCL2) and cytokines (tumour-necrosis- α (TNF- α) and IL-6) were greatly increased in Δ ospI-infected cells at 60 min after infection (Supplementary Fig. 2a). This elevated chemokine and cytokine production was detected as early as 30 min after infection (Fig. 1a and Supplementary Fig. 2b). Increased phosphorylation of inhibitor of NF- κ B (I κ B α) was detected in Δ ospI-infected HeLa cells relative to YSH6000-infected HeLa cells as early as 10 min after infection (Fig. 1b). The nuclear translocation of NF- κ B (p65 subunit) was fourfold higher in cells infected with Δ ospI compared with YSH6000 at 20 min after infection (Fig. 1c and Supplementary Fig. 3), suggesting that OspI can dampen the acute inflammatory response.

We next tested whether OspI inhibits NF- κ B activation when *S. flexneri* infects cells, and we found that ectopic OspI expression further inhibited NF- κ B activation on *S. flexneri* infection (Fig. 1d). When *S. flexneri* infects epithelial cells, NOD1-RIP2 (nucleotide-binding oligomerization domain 1-receptor-interacting serine/threonine kinase

Crystal structure of quinol-dependent nitric oxide reductase from *Geobacillus stearothermophilus*

Yushi Matsumoto^{1,3}, Takehiko Toshi¹, Andrei V Pislakov², Tomoya Hino^{1,3}, Hiroshi Sugimoto¹, Shingo Nagano^{1,3}, Yuji Sugita² & Yoshitsugu Shiro¹

The structure of quinol-dependent nitric oxide reductase (qNOR) from *G. stearothermophilus*, which catalyzes the reduction of NO to produce the major ozone-depleting gas N₂O, has been characterized at 2.5 Å resolution. The overall fold of qNOR is similar to that of cytochrome *c*-dependent NOR (cNOR), and some structural features that are characteristic of cNOR, such as the calcium binding site and hydrophilic cytochrome *c* domain, are observed in qNOR, even though it harbors no heme *c*. In contrast to cNOR, structure-based mutagenesis and molecular dynamics simulation studies of qNOR suggest that a water channel from the cytoplasm can serve as a proton transfer pathway for the catalytic reaction. Further structural comparison of qNOR with cNOR and aerobic and microaerobic respiratory oxidases elucidates their evolutionary relationship and possible functional conversions.

NOR is a membrane-integrated, iron-containing enzyme involved in the microbial denitrification process. Microbial denitrification is an example of anaerobic respiration, where nitrate (NO₃⁻) is used as a terminal electron acceptor and is sequentially reduced: NO₃⁻ → NO₂⁻ → NO → N₂O → N₂¹⁻⁴. Macrophages use nitric oxide as a chemical weapon against infectious agents; therefore, pathogenic bacteria use NOR as a defense against the immune system^{5,6}. In these biological processes, NOR catalyzes the reduction of nitric oxide (NO) to nitrous oxide (N₂O) with two protons and two electrons (2NO + 2H⁺ + 2e⁻ → N₂O + H₂O) through cleavage of the N-O bond and concomitant N-N bond formation.

The study of NORs is also an area of interest for the environmental sciences because NO belongs to the NO_x group of air pollutants. In addition, the product, N₂O is both an ozone-depleting gas and a

respiration) during their molecular evolution. Thus, NOR and COX have been classified as members of the heme-copper oxidase (HCO) superfamily. However, there is no evidence that NOR contributes to the generation of the proton gradient across the membrane^{20,21}, whereas COX can produce the proton gradient by pumping protons from the inside to the outside of the cellular membrane in a process coupled with O₂ reduction. The proton gradient can be used for ATP synthesis. Knowledge of the structures of the respiratory enzymes is invaluable in understanding functional conversions in the enzymes of the HCO superfamily—for example, in their chemical reactivity and proton-pumping ability.

Analysis of known bacterial NOR amino acid sequences shows that there are two subgroups consisting of distinct combinations of subunits and cofactors^{2,4}. The first subgroup, which is called cNOR (for

Structural basis of tRNA agmatinylation essential for AUA codon decoding

Takuo Osawa¹, Satoshi Kimura², Naohiro Terasaka², Hideko Inanaga¹, Tsutomu Suzuki² & Tomoyuki Numata^{1,3}

The cytidine at the first position of the anticodon (C34) in the AUA codon-specific archaeal tRNA^{Ile2} is modified to 2-agmatinylycytidine (agm²C or agmatidine), an agmatine-conjugated cytidine derivative, which is crucial for the precise decoding of the genetic code. Agm²C is synthesized by tRNA^{Ile}-agm²C synthetase (TiaS) in an ATP-dependent manner. Here we present the crystal structures of the *Archaeoglobus fulgidus* TiaS-tRNA^{Ile2} complexed with ATP, or with AMPCPP and agmatine, revealing a previously unknown kinase module required for activating C34 by phosphorylation, and showing the molecular mechanism by which TiaS discriminates between tRNA^{Ile2} and tRNA^{Met}. In the TiaS-tRNA^{Ile2}-ATP complex, C34 is trapped within a pocket far away from the ATP-binding site. In the agmatine-containing crystals, C34 is located near the AMPCPP γ-phosphate in the kinase module, demonstrating that agmatine is essential for placing C34 in the active site. These observations also provide the structural dynamics for agm²C formation.

Accurate translation depends on cognate codon recognition by the tRNA anticodon on the ribosome. Post-transcriptional modifications at the first position of the anticodon (position 34 or the wobble position) have an important role in the precise decoding of the genetic code, by ensuring wobble pairing with the third base of the codon¹⁻³. The wobble modifications also sometimes serve as determinants for tRNA recognition by the cognate aminoacyl-tRNA synthetases⁴⁻⁶.

Agm²C (Supplementary Fig. 1) is located at the wobble position of the archaeal AUA codon-specific isoleucine tRNA (tRNA^{Ile2})^{7,8}. The unmodified tRNA^{Ile2} bears the CAU anticodon, which is also found in tRNA^{Met} responsible for AUG codon decoding (Supplementary Fig. 2). Archaeal tRNA^{Ile2} with unmodified C34 is aminoacylated by methionyl-tRNA synthetase (MetRS)⁹ and deciphers the AUG codon⁷, thus behaving like tRNA^{Met}. The agm²C modification allows

the mechanism for the agm²C modification is quite different from that for the lysidine modification by the tRNA^{Ile}-lysine synthetase (Tils)¹²⁻¹⁷, which contains an N-type ATP pyrophosphatase motif¹⁸ and activates C34 by adenylation (Supplementary Fig. 1). Although TiaS catalyzes agm²C formation in an ATP-dependent manner⁷, an obvious ATP-binding motif is not apparent in the primary structure, so the mechanism of agm²C formation has remained obscure. To elucidate the mechanisms for the specific recognition of tRNA^{Ile2} and for the ATP-dependent formation of agm²C by TiaS, we determined the crystal structures of the *A. fulgidus* TiaS-tRNA^{Ile2} complex in two discrete forms. Our structural and functional analyses identified a previously unknown kinase module and revealed the structural dynamics of the RNA modification process.

RECIITC

Biogenesis of 2-agsmatinylcytidine catalyzed by the dual protein and RNA kinase TiaS

Naohiro Terasaka^{1,4}, Satoshi Kimura^{1,4}, Takuo Osawa², Tomoyuki Numata^{2,3} & Tsutomu Suzuki¹

The archaeal AUA-codon specific tRNA^{Ile} contains 2-agsmatinylcytidine (agm²C or agmatidine) at the anticodon wobble position (position 34). The formation of this essential modification is catalyzed by tRNA^{Ile}-agm²C synthetase (TiaS) using agmatine and ATP as substrates. TiaS has a previously unknown catalytic domain, which we have named the Thr18-Cyt34 kinase domain (TCKD). Biochemical analyses of *Archaeoglobus fulgidus* TiaS and its mutants revealed that the TCKD first hydrolyzes ATP into AMP and pyrophosphate, then phosphorylates the C2 position of C34 with the γ -phosphate. Next, the amino group of agmatine attacks this position to release the phosphate and form agm²C. Notably, the TCKD also autophosphorylates the Thr18 of TiaS, which may be involved in agm²C formation. Thus, the unique kinase domain of TiaS catalyzes dual phosphorylation of protein and RNA substrates.

Precise decoding of the genetic code is a fundamental process for all living organisms. Transfer RNAs (tRNAs) frequently include chemical modifications at the first (wobble) position of the anticodon that enable tRNAs to accurately recognize cognate codons by stabilizing the pairing between the wobble base and the third base of the codon at the ribosomal decoding center¹⁻³. The AUA codon can be deciphered by several wobble modifications of tRNAs^{Ile}. In eukaryotes, tRNA^{Ile} bearing pseudouridine (Ψ) or inosine (I) at the wobble position (position 34) decodes the AUA codon by forming a Ψ -A or I-A pairing. In most bacteria and some organelles, the AUA codon is deciphered with tRNA^{Ile} bearing the lysine-conjugated cytidine derivative lysidine (L) at the wobble position, by forming an L-A pairing^{4,5}. The precursor form of tRNA^{Ile}, which bears an unmodified C at the wobble position, behaves as a tRNA^{Met}, which would be charged with methionine and would decode the AUG codon. The wobble modifications thus confer the isoleucine specificity and AUA codon-decoding ability

unmodified C34 was methionylated⁹, and mature tRNA^{Ile} was isoleucylated *in vitro*⁹. Because agmatine is a direct metabolic substrate for agm²C formation in archaeal cells⁷, and agmatine is an essential metabolite for the viability of *Thermococcus kodakaraensis*¹⁰, agm²C and its modifying enzyme are assumed to be essential in archaeal cells. These findings demonstrate that bacteria and archaea adopted and evolved a similar strategy for decoding the AUA codon.

While investigating the biogenesis of agm²C, our group previously identified TiaS (tRNA^{Ile} agm²C synthetase), the enzyme that catalyzes agm²C formation using ATP and agmatine as substrates⁷ (Supplementary Fig. 1). Although agm²C has a chemical structure similar to lysidine, TiaS constitutes a class of enzyme distinct from Tils. These findings implied that the wobble modifications and modifying enzymes in archaea (agm²C and TiaS) and bacteria (lysidine and Tils) might have evolved independently—but convergently—from different ancestors. TiaS has three conserved motifs: DUF1743, an

Structure of the measles virus hemagglutinin bound to its cellular receptor SLAM

Takao Hashiguchi¹, Toyoyuki Ose², Marie Kubota¹, Nobuo Maita^{3,4}, Jun Kamishikiryo³, Katsumi Maenaka^{2,3,5} & Yusuke Yanagi¹

Measles virus, a major cause of childhood morbidity and mortality worldwide, predominantly infects immune cells using signaling lymphocyte activation molecule (SLAM) as a cellular receptor. Here we present crystal structures of measles virus hemagglutinin (MV-H), the receptor-binding glycoprotein, in complex with SLAM. The MV-H head domain binds to a β -sheet of the membrane-distal ectodomain of SLAM using the side of its β -propeller fold. This is distinct from attachment proteins of other paramyxoviruses that bind receptors using the top of their β -propeller. The structure provides templates for antiviral drug design, an explanation for the effectiveness of the measles virus vaccine, and a model of the homophilic SLAM-SLAM interaction involved in immune modulations. Notably, the crystal structures obtained show two forms of the MV-H-SLAM tetrameric assembly (dimer of dimers), which may have implications for the mechanism of fusion triggering.

Measles still causes 4% of all deaths in children under age 5 worldwide, despite the availability of an effective live vaccine and the great efforts made to deliver vaccine to children throughout the world^{1,2}. Outbreaks continue to occur, even in industrialized nations when vaccination coverage is low². Measles virus is an enveloped virus with a nonsegmented, negative-strand RNA genome, and is classified as a member of the family Paramyxoviridae³. To enter a cell, enveloped viruses must bind to their receptors on host cells and induce fusion of the viral membrane with the host cell membrane⁴. Paramyxoviruses attach to and fuse with host membranes at the cell surface, using two distinct envelope proteins. Of these, the attachment protein is responsible for receptor binding whereas the fusion protein mediates membrane fusion⁵. The mechanism by which receptor binding leads to fusion is not well understood⁵⁻⁸. The

2B4, CD48, CD84, CD229, CD319 and natural killer, T- and B-cell antigen (NTB-A)^{11,12}. The SLAM family shares a similar immunoglobulin (Ig) domain-containing structural organization. SLAM is expressed on thymocytes, activated lymphocytes, mature dendritic cells, macrophages and platelets¹², and is also a marker for the most primitive hematopoietic stem cells¹³. It acts as a self ligand, interacting with another SLAM molecule present on an adjacent cell at a low affinity ($K_d \cong 200 \mu\text{M}$)¹⁴. The distribution and function of SLAM may explain the tropism and immunosuppressive nature of measles virus¹⁰.

Although SLAM is the predominant receptor for wild-type, circulating field isolates of measles virus, vaccine strains of the virus use CD46 as an alternate receptor, owing to amino acid changes in the attachment protein MV-H^{10,15-17}. An as-yet-unknown receptor

Molecular Cell 44, 462-475 (2011).

Structural Basis of Atg8 Activation by a Homodimeric E1, Atg7

Nobuo N. Noda,^{1,3,5,*} Kenji Satoo,^{2,5} Yuko Fujioka,^{1,3} Hiroyuki Kumeta,³ Kenji Ogura,³ Hitoshi Nakatogawa,⁴ Yoshinori Ohsumi,⁴ and Fuyuhiko Inagaki^{3,*}

¹Institute of Microbial Chemistry, Tokyo, Tokyo 141-0021, Japan

²Department of Structural Biology, Graduate School of Life Science

³Department of Structural Biology, Faculty of Advanced Life Science Hokkaido University, Sapporo 001-0021, Japan

⁴Frontier Research Center, Tokyo Institute of Technology, Yokohama 226-8503, Japan

⁵These authors contributed equally to this work

*Correspondence: nn@bikaken.or.jp (N.N.N.), finagaki@pharm.hokudai.ac.jp (F.I.)

DOI 10.1016/j.molcel.2011.08.035

SUMMARY

E1 enzymes activate ubiquitin-like proteins and transfer them to cognate E2 enzymes. Atg7, a noncanonical E1, activates two ubiquitin-like proteins, Atg8 and Atg12, and plays a crucial role in autophagy. Here, we report crystal structures of full-length Atg7 and its C-terminal domain bound to Atg8 and MgATP, as well as a solution structure of Atg8 bound to the extreme C-terminal domain (ECTD) of Atg7. The unique N-terminal domain (NTD) of Atg7 is responsible for Atg3 (E2) binding, whereas its C-terminal domain is comprised of a homodimeric adenylation domain (AD) and ECTD. The structural and biochem-

biochemical studies on E1 antecedents MoeB (Lake *et al.*, 2001) and ThiF (Duda *et al.*, 2005), as well as on E1 enzymes for Ub (Lee and Schindelin, 2008), NEDD8 (Huang *et al.*, 2005, 2007; Walden *et al.*, 2003a, 2003b), and SUMO (Lois and Lima, 2005; Olsen *et al.*, 2010) revealed the common architecture of canonical E1s and established the molecular mechanisms of the specific recognition and reactions catalyzed by E1s; these canonical E1s have a heterodimeric architecture, consisting of one active adenylation domain (AD) and one inactive AD. In addition, they possess a C-terminal ubiquitin-fold domain (UFD) and a catalytic cysteine domain composed of two half domains. They recognize UbIs with their active AD and catalytic cysteine domain, while they recognize cognate E2s with their UFD and catalyze UbI activation and transfer through dynamic rearrangement of these domains (Huang *et al.*, 2007; Olsen *et al.*, 2010;

EMBO Journal 30, 2734-2747 (2011).

Structural basis of cargo recognition by the myosin-X MyTH4-FERM domain

EMBO
open 

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial Share Alike 3.0 Unported License, which allows readers to alter, transform, or build upon the article and then distribute the resulting work under the same or similar license to this one. The work must be attributed back to the original author and commercial use is not permitted without specific permission.

Yoshinori Hirano¹, Taiki Hatano¹,
Aya Takahashi¹, Michinori Toriyama²,
Naoyuki Inagaki² and Toshio Hakoshima^{1,*}

¹Structural Biology Laboratory, Nara Institute of Science and Technology, Nara, Japan and ²Signal Transduction Laboratories, Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology, Nara, Japan

Myosin-X is an important unconventional myosin that is critical for cargo transportation to filopodia tips and is also utilized in spindle assembly by interacting with microtubules. We present a series of structural and biochemical studies of the myosin-X tail domain cassette, consisting of myosin tail homology 4 (MyTH4) and FERM domains in complex with its specific cargo, a netrin receptor DCC (deleted in colorectal cancer). The MyTH4 domain is folded into a helical VHS-like structure and is associated with the FERM domain. We found an unexpected binding mode of the DCC peptide to the subdomain C groove of the FERM domain, which is distinct from previously reported β - β associations found in radixin-adhesion molecule complexes. We also revealed direct interactions between the

tion (Berg *et al.*, 2001; Richards and Cavalier-Smith, 2005; Foth *et al.*, 2006; Woolner and Bement, 2009). Myosins consist of three distinct regions, a head, neck and tail. The heads contain actin-based motor domains that display homology among different myosins and these structures have been extensively studied (O'Connell *et al.*, 2007). In sharp contrast to the motor domains, the tails display diversity by combination of a variety of functional domains that mediate cargo recognition, which determine the individual cellular functions of myosins. However, little is known about the tail domain structures and their specific cargo recognition.

Myosin-X (Myo-X, myosin-10, Myo10) is an unconventional myosin implicated in elongation of filopodia, which function as tentacles that explore and interact with cell surroundings to determine the direction of cell movement and to establish cell adhesion such as in the case of synapses (Sousa and Cheney, 2005). Myosin-X is localized at filopodia tips containing a 'filopodial-tip complex', which act as fingertips and sensors in processes such as signal perception, cell signalling, actin polymerization inside of filopodia and adhesion (Berg *et al.*, 2000; Berg and Cheney, 2002).

Proc Natl Acad Sci USA **108**, 20520-5 (2011).

Specific recognition of linear ubiquitin chains by the Npl4 zinc finger (NZF) domain of the HOIL-1L subunit of the linear ubiquitin chain assembly complex

Yusuke Sato^{a,b}, Hiroaki Fujita^c, Azusa Yoshikawa^{a,d}, Masami Yamashita^{a,b}, Atsushi Yamagata^{a,b}, Stephen E. Kaiser^e, Kazuhiro Iwai^{c,f,1}, and Shuya Fukai^{a,b,1}

^aStructural Biology Laboratory, Life Science Division, Synchrotron Radiation Research Organization and Institute of Molecular and Cellular Biosciences, University of Tokyo, Tokyo 113-0032, Japan; ^bDepartment of Medical Genome Sciences, Graduate School of Frontier Sciences, University of Tokyo, Chiba 277-8501, Japan; ^cCell Biology and Metabolism Group, Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University, Osaka 565-0871, Japan; ^dDepartment of Biological Information, Tokyo Institute of Technology, Yokohama 226-8501, Japan; ^eDepartment of Biology, Stanford University, Stanford, CA 94305; and ^fDepartment of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Medicine, Osaka University, Osaka 565-0871, Japan

Edited by Axel T. Brunger, Stanford University, Stanford, CA, and approved October 13, 2011 (received for review June 10, 2011)

The linear ubiquitin chain assembly complex (LUBAC) is a key nuclear factor- κ B (NF- κ B) pathway component that produces linear polyubiquitin chains. The HOIL-1L subunit of LUBAC has been shown to bind linear chains; however, detailed structural and functional analyses on the binding between LUBAC and linear chains have not been performed. In this study, we found that the Npl4 zinc finger (NZF) domain of HOIL-1L specifically binds linear polyubiquitin chains and determined the crystal structure of the HOIL-1L NZF domain in complex with linear diubiquitin at 1.7-Å resolution. The HOIL-1L NZF domain consists of a zinc-coordinating "NZF core" region and an additional α -helical "NZF tail" region. The HOIL-1L NZF core binds both the canonical Ile44-centered hydrophobic surface on the distal ubiquitin and a Phe4-centered hydrophobic patch on the proximal ubiquitin, representing a mechanism for the specific recognition of linear chains. The NZF tail binds the proximal ubiquitin to enhance the binding affinity. These recognition mechanisms were supported by the accompanying *in vitro* and *in vivo* structure-based mutagenesis experiments.

munodeficiency in mice (17–21). SHARPIN can form a heterodimeric complex with HOIP and a heterotrimeric complex with HOIP and HOIL-1L. Both complexes can conjugate linear chains on NEMO as well as the heterodimeric complex consisting of HOIP and HOIL-1L (17–19). The conjugated linear chains are specifically recognized by NEMO, HOIL-1L, and SHARPIN and are critical for NF- κ B activation.

Both HOIL-1L and SHARPIN contain a Ub-like (UBL) domain and a Npl4 zinc-finger (NZF) domain (22). The UBL domains of HOIL-1L and SHARPIN are required for the binding to HOIP to assemble LUBAC (17–19). Although the UBL domain of HOIL-1L (and presumably SHARPIN) is sufficient to support linear chain synthesis by HOIP (22), cytokine induced NF- κ B activation requires the NZF domain of HOIL-1L and SHARPIN (16–18). NZF domains are typically approximately 30 residue protein–protein interaction modules that coordinate a single zinc ion with four conserved cysteine residues (23, 24). Most NZF domains found in proteins involved in Ub-related processes bind to Ub with moderate affinities (K_d values of 100 μ M or higher)

Nature Communication **2**, 475-9 (2011).

ARTICLE

Received 14 Mar 2011 | Accepted 22 Aug 2011 | Published 20 Sep 2011

DOI: 10.1038/ncomms1488

An energy transduction mechanism used in bacterial flagellar type III protein export

Tohru Minamino^{1,2}, Yusuke V. Morimoto¹, Noritaka Hara¹ & Keiichi Namba¹

Flagellar proteins of bacteria are exported by a specific export apparatus. Flil ATPase forms a complex with FliH and FliJ and escorts export substrates from the cytoplasm to the export gate complex, which is made up of six membrane proteins. The export gate complex utilizes proton motive force across the cytoplasmic membrane for protein translocation, but the mechanism remains unknown. Here we show that the export gate complex by itself is a proton–protein antiporter that uses the two components of proton motive force, $\Delta\psi$ and Δ pH, for different steps of the protein export process. However, in the presence of FliH, Flil and FliJ, a specific binding of FliJ with an export gate membrane protein, FlhA, is brought about by the FliH–Flil complex, which turns the export gate into a highly efficient, $\Delta\psi$ -driven protein export apparatus.

(2) ホームページ (HP)

HPは平成22年度9月に開設した。まず、フロントページで、本学術領域研究の立ち上げに至った経緯と基本的な考え方を紹介して、関連研究者や周辺研究者の理解を求めるとともに、賛同する研究者の参画を促すように勤めた（領域代表の挨拶）。その他、ニュース、研究成果、組織、シンポジウム・領域会議、研究相談、お問い合わせのメニューをつけた。

研究のメニューでは、概要、研究推進図、研究の目的と意義を説明して、3つの研究項目での計画研究の概要と、公募研究の公募要領（文部科学省の科学研究費の公募要領に掲載したもの）と、＜補足＞と題して、公募要領の背景を説明して、各研究項目や、研究のタイプ（総額400万円以下と、200万円以下）への応募の判断が円滑にできるように配慮した。

成果のメニューでは、最新の発表論文のabstractと日本語による短い解説と説明図を一枚掲載することで、一般研究者等でも理解が得られるように工夫した。また、PubMedへリンクを張って、各雑誌のHPから原論文をダウンロードできるようにした。この記事は、毎月各研究班員へ配信するニュースレター（PDFファイル）の「Topics」欄にまとめてあり、各班員の利便を図った。

組織のメニューでは、各研究項目毎に、各研究班員の課題を掲載して、訪問研究者の本学術領域の理解を図った。また、シンポジウム・班会議メニューでは、本領域の総括班会議、研究領域の全体会議、幹事会、公開シンポジウムの予告等を掲載して、広く一般の訪問者に告知するとともに研究班員の利便を図っている。

(3) 公開発表等

シンポジウム・セミナー等

平成22年度は、6月末の採択通知を受けて、研究代表者の奈良先端・箱嶋が、申請書に基づいて5年間の具体的な運営分担や予定表を作成した。これをたたき台として、具体的な体制・方針・予定を決定するために、まず、3つの研究項目の幹事予定者（A01 東大・深井、A02 産総研・千田、A03北大・前仲）と箱嶋の4人で幹事会を東京（丸の内）で開催した。ホームページ（HP）の作成は前仲が担当することとして、早急に業者の選定と接触を開始した。

各年度1回の総括班会議・研究領域全体会議・公開シンポジウム、ならびに方法論連絡会の担当を決定した。特に公開シンポジウムは学会のシンポジウムやワークショップを利用することを確認した。このことは、文部科学省の学術審議官とも相談して了解を得た。そこで、12月10日には、BMB2010（神戸国際会議場）で「構造細胞生物学の新展開」（オーガナイザー：千田、深井、参加人数200人）を開催して、これからの5年間のこの新学術領域研究の方向性を、計画班員の研究を通して、多くのBMB参加研究者に公開した。

平成23年度は、6月9日には、第11回蛋白質科学会(大阪サンパレス)にて、公開シンポジウム（第1回方法論連絡会）としてワークショップ「タンパク質複合体研究のひと工夫」（オーガナイザー：千田、深井、参加人数150人）を開催して、複合体の構造研究の方法論に焦点を当てて、最新の技法や考え方を討論した。これは、新たに加わった公募班員も参加できる早い時期で、本領域参加研究者全員に新しい方法論やアプローチが周知できるという前年度総括班会議での検討の結果開催された。こういった構造生物学の方法論のセミナーやワークショップは好評なので、来年も続けることとした。

平成24年度は、第3回公開シンポジウム（第2回方法論連絡会）「先端的タンパク質研究の

ための実験技術」を、6月20日には、第12回蛋白質科学会（名古屋国際会議場）のワークショップ1WC（オーガナイザー：前仲勝実・千田俊哉，参加人数約200人）で開催した。150人用の部屋で開催したが，参加者が入りきれずに多くの立ち見が出ており，タンパク質研究においては，実験技術や方法論への関心の強さを改めて確認した。

また，12月12日には，第35回日本分子生物学会（福岡国際会議場）では，ワークショップW63：「植物ホルモン受容体とシグナリングの分子レベルの生物学」（オーガナイザー：箱嶋敏雄，東大・経塚淳子）を開催して，分子生物学会非会員等の演者の旅費等の支援をする。更に，12月14日には，第85回日本生化学会（福岡国際会議場・マリンメッセ福岡）の大会企画シンポジウム「深化する構造生物学」（オーガナイザー：九大・神田大輔，稲垣冬彦）では，新進気鋭の構造生物学研究者，Dr CG Kalodimos (Rutgers University)の旅費等を支援することとしている。本新学術領域参画者が，これらのシンポジウムやワークショップで有益な新情報の収集や知的な刺激を受けて，研究推進に生かされることを期待している。

招待講演等

International symposium/workshops/Seminar等での英語での講演が**52件**（国外での開催29件・国内開催23件），国内の学会等での日本語での講演が**70件**であり，合計 **122件**の招待講演がある（2012年5月末日現在）。以下に主な招待講演を一覧する。

2012

- 1) Snake venom metalloproteinases: structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins.
Takeda S.
The 17th World Congress of the International Society on Toxinology, Honolulu, July 13 (2012)
- 2) Switching mechanism of flagellar motor rotation.
*Minamino, T.
Gordon Conference on Sensory Transduction in Microorganisms. Ventura, California, USA. Jan. 18 (2012).
- 3) Studies of the structure and molecular mechanisms of the proteasome assembly.
Mizushima, T.
The Annual Review Conference of the Global COE program of University of Hyogo, "Picobiology: Life Science at the Atomic Level" for the final fiscal year, Hyogo, Feb. 13 (2012).

2011

- 4) Structural cell biochemistry of a novel histone fold vertebrate kinetochore complex: CENP-TW and CENP-SX form a heterotetramer,
Nishino, T.
American Society for Cell Biology, Colorado, USA, Dec. 6 (2011).
- 5) Weak and transient interaction underlying the transcriptional corepressor SHARP/SMRT complex.
Mishima, M., Teppei Kanaba, Ayaho Kobayashi, Yutaka Ito, Suzuka Mikami
International Symposium on NMR (ISNMR2011), Yokohama, Nov. 17 (2011).
- 6) Development of interferogram extrapolation method for NMR experiments that requires accurate peak height,
Takumi Ueda, Masahiko Matsumoto, Ichio Shimada,
ISNMR2011, Yokohama, Nov. 17 (2011).
- 7) Thermodynamic analysis of multi-domain proteins with domain-domain interactions,
Uchiyama, S.

- Development in Protein Interaction analysis 2011 (DiPIA2011)*, Boston, Nov. 14 (2011).
- 8) Structural view of plant hormone nuclear receptors.
Hakoshima, T., Murase, K., Hirano, Y. and Sun, T.-p.
International Symposium, Achievements and Future (Global COE), Nara, Nov. 8 (2011).
 - 9) Structural basis of sugar recognition by intracellular lectins involved in glycoprotein transport and degradation.
Satoh, T.
"Toward Systems Glycobiology", Nagoya University Global COE Mini-Symposium, Nagoya, Nov. 7 (2011).
 - 10) Structural basis for the transcriptional regulation by SHARP.
Mishima, M.
The 4th Asia-Pacific NMR Symposium, Beijing, Oct. 18 (2011).
 - 11) Crystal structure reveals how spackle protein (gp61.3) inhibits lysozyme activity of gp5 tail lysozyme from bacteriophage T4.
Kanamaru, S.
XXIInd Biennial Conference on Phage/Virus Assembly, The Marine Sciences Institute, Oct. 9-14 (2011).
 - 12) Crystal structure of recombination activator, Swi5-Sfr1 complex, from fission yeast
Shimizu T.
"New frontier of the research in Rad51 recombinase and its accessory proteins", Institut de Biologie Physico Chimique, France, Sep. 27-28 (2011).
 - 13) Oxygen Activation and Oxidative Modification in Heme-Regulated Proteins
Ishimori, K.
14th Asian Chemical Congress, Bangkok, Thailand, Sept. 5-8, (2011).
 - 14) Structural basis of cargo recognition by the myosin-X MyTH4-FERM domain.
Hirano, Y., Hatano, D., Toriyama, M. Inagaki, N. and Hakoshima, T.
"Microsymposium on signal transduction" in *IUCr General Assembly*, Madrid, Spain, August 24 (2011)
 - 15) Structural analyses of mouse MD-1 protein complexed with endogenous phospholipid.
Ohto, U., Harada, H., and Satow, Y.,
IUCr General assembly, Madrid, Spain, August 24 (2011)
 - 16) Structural basis for receptor recognition and entry of measles virus.
Hashiguchi T, Ose T, Kubota M, Sako M, Kajikawa M, Ito Y, Fukuhara H, Kuroki K, Maita N, Kamishikiryo J, Yanagi Y, Maenaka K.
MEASLES VIRUS MINI-SYMPOSIUM. Mayo Clinic, Rochester, USA July 15 (2011).
 - 17) Structural cell biochemistry of a novel histone fold vertebrate kinetochore complex.
Nishino, T.
Gordon conference on Chromosome dynamics, Vermont, USA, July 12 (2011).
 - 18) Mechanistic insights into the activation of the Rad51-mediated strand exchange from the structure of a recombination activator, the Swi5-Sfr1 complex
Shimizu, T.
"Symposium on Structure and Folding of Disease Related Proteins", Seoul National University, Korea, July 8 (2011)
 - 19) New insight into the regulatory mechanism of G protein signaling.
Itoh, H.
"Structure and function of GPCR signaling system: the frontier of the future drug development", *JBS symposium*, Kyoto, May 22 (2011)

- 20) Heme-Mediated Iron Regulation.
H. Okutani, Y. Miyaji, Y. Takeda, T. Uchida, K. Iwai, and K. Ishimori
JBS Kyusyu Symposium, Kurume, Japan, May 21-22 (2011).
- 21) Structural basis of ubiquitin chain recognition by NZF domains for NF- κ B activation.
Fukai, S.
TNF2011, Awaji, May 18 (2011)
- 22) Structure-Based Model of the Biological Signaling from Histone Modifications to Structural Change of the Nucleosome.
Senda, T.
“*International symposium on the physicochemical field for genetic activities*”, Awaji, Jan. 24-26 (2011).

2010

- 23) Mechanisms for recognition of K63-linked polyubiquitin chains
Fukai, S.
International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem2010), Hawaii, Dec. 19 (2010).
- 24) NMR studies of molecular interaction using PCS and nanodisc.
Inagaki, F.
Pacifichem2010, Honolulu, Hawaii, Dec. 15-20 (2010).

(4) 「国民との科学・技術対話」

国民との対話では、合計で**31件**のアウトリーチ活動を行ってきている（2012年5月末日現在）。これらの中には、所属機関である大学や研究所が定例で主宰しているアウトリーチ活動の一環として行ったものも多い。例えば、一般社会人や大学を対象とした「研究体験」、「サマースクール」、「サイエンスキャンプ」等である。参加人数も数名から数十人規模まで様々であり、アンケート結果もさまざまであるが、例えば、高校生（長崎北陽台高校理数科生徒21人，東大分生研訪問：深井担当）の場合，講義・見学等の内容については，やはり難しいと感じた生徒が多かったが，とても興味深く，もっと知りたいという評判であった。

所属機関主宰のアウトリーチ活動にも，小学生等の子供向けのものや，高校生，大学生向け，あるいは，地方自治体と連携した一般市民向けの公開講座等，極めて多くのアウトリーチ活動が年間を通して企画されており，こういった体験学習や見学・講義と言った形態でのアウトリーチ活動は，ほぼ飽和状態になっているのではないかと思う。

少し珍しいアウトリーチ活動としては，高等学校で汎用されている教材や，高等学校の理科教師向けの情報誌への執筆がある。例えば，**フォットサイエンス生物図録** 新課程版（鈴木孝仁監修）（数研出版：2011年12月初版出版）中の**囲み記事「Pioneer：ジベレリンの作用機構を解析」**を担当した（箱嶋）。この書籍は，高校生物の受験参考書・副読本として広く活用されており（年間10万冊！），「Pioneer」は，研究の最前線とその研究室を紹介する記事であり，植物ホルモンの研究の最前線では，受容体タンパク質分子がホルモン分子をどのように識別して，その情報を如何に伝えるかという機能メカニズムを原子レベルで解析する構造生物学という分野が発展していることを紹介した。

また，全国の高等学校の理科教師向け機関誌，**理科通信「サイエンスネット」** 43（数研出版），6-9（2011）には，「植物ホルモン受容体の分子構造研究」と題して，植物ホルモンの理解の現状と，発見されてきた受容体タンパク質の特徴を平易に要約して，高校生物の延長線上につなげて，学生の興味を惹きつける授業の資料となるように配慮した（箱嶋）。

8. 研究領域の研究組織と各研究項目の連携状況

(1) 連携状況

本領域研究では、「3. 研究領域の目的及び概要」の項でも述べたように、3つの研究項目A01~A03を縦糸として、公募研究では、構造生物学的な展開を目指す分子細胞生物学、生化学、植物学、分子医学等の研究者の提案を取り入れて、各研究項目の中で広い分野にわたって課題を設定している。一方、計画研究の構成員には、構造生物学の方法論（X線結晶構造解析、シンクロトロン放射光、電顕、NMR、物性・相互作用解析、タンパク質工学・組み替えタンパク質生成技術等）の専門家を配しており、各研究課題での技術的困難等の解決のために連携を横糸として、全体の研究を推進するという組織の設計をしている。この方法論での連携や有効な手法の共有は本領域の成否を決めると考えるので、方法論のシニアな研究者も、連携研究者の総括班評価者として参画して頂いている。

この体制は上手く機能しており、密な共同研究のみならず、連携あるいは協力関係、情報交換と言った弱いものも含めて、極めて多くの交流がある。領域全体の会議（報告会）では、タンパク質の発現・精製、結晶化あるいは構造解析におけるの問題点や技術的な困難についての報告に対して、複数の適切なアドバイスや問題解決のヒントが提供されており、大抵の実験上の困難に対しては誰かがアドバイスできるようになっており、良い「研究コミュニティー」になっていると思う。

連携や協力関係で際立って件数が多いのは、今のところ、

1. 前仲・北大薬（A03） カイコ等特殊なタンパク質発現系の提供・指導
 2. 佐藤・産総研（A01） 電顕による一粒子解析
 3. 稲垣：北大先端生命（A03） ナノディスクを用いた膜タンパク質や脂質の相互作用解析
 4. 内山・阪大（A02） HD交換等による分子相互作用面の解析
 5. 山下・阪大蛋白研（A01） 微小結晶のX線強度データ収集
- 等である。

また、多くの共同研究が進行しており、例えば、

1. X線の専門家の箱嶋・奈良先端（A01）と伊東・奈良先端大（A01 公募）の三量体GTPaseの細胞質GEF Ric-8の研究
2. 電顕の専門家である佐藤・産総研（A01）と医科学の黒河・東北大医（A01 公募）との酸化ストレスセンサーKeap1の研究
3. X線の専門家の深井・東大放射光機構（A01）と神経科学の植村・東大医（A03 公募）とのシナプス形成におけるGluRδ2-Cbln1-NRXN三者複合体の構造・機能の研究
4. X線の専門家の深井・東大放射光機構（A01）と白川・東北大加齢研（A03 公募）とのRalGAP-Ral GTPase複合体の構造・機能の研究
5. X線の専門家である楠木・山梨大工（A02 公募）とRNAの専門家の坂本・千葉工大（A02 公募）との肝炎ウイルスタンパク質NS5AのRNAアプタマーの研究
6. X線の専門家の箱嶋・奈良先端（A01）と佐藤・産総研（A01）と千田・産総研（A02）との、難結晶化タンパク質の結晶化の改善や結晶化スクリーニングの効率化・迅速化についての研究

等である。

また、他の新学術領域研究との共同研究（畠山・東大医「発がんスパイラル」と千田・産総研（A02）とのピロリ菌CagAの構造研究）や、特別推進研究との共同研究（笹川・東大医「病原細菌の自然免疫克服戦略の解明とその応用」と水島・兵庫大（A03）との赤痢菌

OspI の構造研究) もある。

(2) 研究組織

本新学術領域は次世代の若手構造生物学者の育成も考慮して、若手研究者の参画が多い研究組織としてある。ちなみに、研究代表者の**7割**が若手研究者（教授以外）であり、13人の教授の中で、**5名**は新任教授（就任2-3年以内）である。

計画研究の研究代表者 7名（教授 3, グループ長1, 准教授1, 主任研究員1, 助教1）
公募研究の研究代表者 38名（教授 10, 准教授・講師 12, 助教 10, 研究員 6）
合計 45名

以下に各研究項目毎の参画者の氏名・所属職を一覧する。〈〉には、本学術領域開始後に移動（昇進）のあった若手班員の旧所属と職を記す。

研究項目 A01 細胞内シグナルの検知と伝達の構造生物学

計画	箱嶋敏雄	教授	奈良先端大・バイオ
	三島正規	准教授	首都大学東京（箱嶋の分担研究者）
	平野良憲	助教	奈良先端大・バイオ（箱嶋の連携研究者）
	深井周也	准教授	東京大学・放射光機構
	山形 敦史	助教	東京大学・放射光機構（深井の連携研究者）
	佐藤 裕介	助教	東京大学・放射光機構（深井の連携研究者）
	佐藤主税	グループ長	産総研
	三尾 和弘	主任研究員	産総研（佐藤の連携研究者）
	川田 正晃	主任研究員	産総研（佐藤の連携研究者）
公募	石森浩一郎	教授	北海道大学・理
	黒河博文	講師	東北大学・医
	海野昌喜	准教授	茨城大学・フロンティア
	堅田利明	教授	東京大学・薬
	伊藤弓弦	助教	東京大学・分生研
	石崎敏理	准教授	京都大学・医
	岡田雅人	教授	大阪大学・微研
	南野 徹	准教授	大阪大学・生命機能
	松村浩由	准教授	大阪大学・工
	田中秀明	助教	大阪大学・たんぱく研
	伊東 広	教授	奈良先端大・バイオ
	柴田直樹	准教授	兵庫県立大学・生命理学
	寺脇慎一	助教	群馬大学・工
	杉本 宏	研究員	理化学研究所
	佐藤匡史	准教授	名古屋市立大学・薬
	熊坂 崇	研究員	高輝度光科学研
	村上 緑	助教	名古屋大学・理

研究項目 A02 核内シグナルの認識と応答の構造生物学

計画	千田俊哉	主任研究員	産総研
	山下栄樹	助教	大阪大学・蛋白研
公募	石森浩一郎	教授	北海道大学・理
	清水敏之	教授	東京大学・薬

山本 雅	教授	沖縄大学院/東京大学・医科研
橋本 博	准教授	横浜市立大学・生体ナノ <同・助教>
沼田倫征	研究員	産総研
楠木正巳	教授	山梨大学・医学工学
内山 進	助教	大阪大学・工
西野達哉	助教	遺伝学研究所
鎌田勝彦	研究員	理化学研究所
坂本泰一	准教授	千葉工業大学・工

研究項目A03 医学上重要な分子複合体研究の構造生物学

計画	前仲勝実	教授	北海道大学・薬 <九大生医研准教授>
	稲垣冬彦	特任教授	北海道大学・先端生命
公募	白川龍太郎	助教	東北大学・加齢研
	植村 健	助教	東京大学・医
	大戸 梅治	助教	東京大学・薬
	上田 卓見	助教	東京大学・薬
	禾 晃和	准教授	横浜市立大学・生命ナノ研 <阪大蛋白研・助教>
	水島 恒裕	教授	兵庫県立大学・生命理<名古屋市立大薬・准教授>
	池水 信二	准教授	熊本大学・生命科学
	西田 元彦	研究員	理化学研究所
	武田 壮一	研究員	国立循環器病研究センター
	北所 健悟	准教授	京都工繊大：工芸科学
	津下 英明	教授	京都産業大学・総合生命

総括班

計画	箱嶋敏雄	教授	奈良先端大・バイオ
	深井周也	准教授	東京大学・放射光機構
	佐藤主税	グループ長	産総研
	千田俊哉	主任研究員	産総研
	山下栄樹	助教	大阪大学・蛋白研
	前仲勝実	教授	北海道大学・薬
	稲垣冬彦	特任教授	北海道大学・先端生命
	三島正規	准教授	首都大学東京（箱嶋の分担研究者）
連携研究者	月原富武	教授	兵庫県立大/阪大・蛋白研
	甲斐莊正恒	教授	名大・理/首都大東京・理/阪大・蛋白研
	吉田賢右	教授	京都産業大学・総合生命
	田中啓二	所長	東京都臨床医学総合研
	貝淵弘三	教授	名古屋大学・医
	磯貝 彰	学長	奈良先端大

9. 研究費の使用状況（設備の有効活用、研究費の効果的使用を含む）

全班員に関係の深い設備としては、高精度高速試料回転軸（神津精機社製 QKSU-0, 平成 23 年度 1,081 万円：山下）であり、SPring-8 の阪大蛋白研放射光ビームライン BL44XU に設置して、ユーザーに解放されている。本新学術領域研究内の研究グループの X 線回折実験でマシンタイム中は常時稼働しており、特に、微小結晶には威力を発揮している。使いやすさの評判も高く、研究の推進に大いに寄与している。極めて投資効率の高い買い物となった。

件数の多かった備品としては、4 台のクロマトグラフィーシステム（AKTA purifier, 約 500~750 万円：箱嶋・深井・千田・前仲, 初年度（平成 22 年度））かあるか、これはプログラミングして（半）自動化が可能であり、各研究室のタンパク質試料の調製でフル稼働している。

分子間相互作用の解析機器としては、等温滴定熱量計（Microcal 社製 ITC₂₀₀, 平成 22 年度 34,650 千円：箱嶋）と表面プラズモン共鳴（SPR）分子間相互作用解析装置（GE ヘルスケア社製 BiacoreT100, 平成 21 年度 38,850 千円：深井）および BIAcore 2000 EcoRepro、平成 23 年度 7,350 千円：前仲）を導入しており、前者は、 α -catenin と vinculin, D14 とストリゴラクトン誘導体, D14L と karrikin 誘導体等の相互作用の定量的解析に多用しており、予約制でほぼ毎日稼働しており、後者は、GET 複合体中の分子間相互作用の定量的解析や GDF に対するモノクローナル抗体のスクリーニングや、細胞表面受容体の持つ難しい結合解析に多用しており、研究の推進に大いに寄与している。

その他では、自動微量結晶化装置（TTP LabTech 社製 Mosquito 2-way, 平成 21 年度 13,725 千円）は、迅速かつ高効率な結晶化スクリーニングに大変役立っており、とりわけ、大量に調製することの困難なサンプルでは必要不可欠な装置となっている。いずれも、ほぼ毎日稼働しており、研究の推進に大いに寄与している。

円二色性分散計システム（J-820/日本分光, 平成 22 年度 13,650 千円：千田）は、タンパク質の二次構造解析に利用している。本装置を用いて精製タンパク質、特にドメイン単位で発現させたタンパク質が正しくフォールドしているかどうかを確認している。個々のタンパク質の活性を測定するのが難しいクロマチン因子の発現実験においては必要不可欠な装置である。

二波長近赤外蛍光対応スキャナータイプ画像解析装置（Odyssey/Li-Cor, 平成 22 年度 7,182 千円：千田）は、一度に二種類の抗体を検出できるシステムである。3 者以上の複合体の形成を調べる際には極めて有効で、HIRA などの相互作用活性の検出に利用しており、週に 1-2 回は稼働している。

共焦点スキャナユニット（横河電機, 平成 23 年度 4,494 千円：佐藤主税）は、細胞の蛍光観察用で、共用の予約制でほぼ毎日稼働している。

高機能高速冷却遠心機(Avanti HP-26XP, 平成 22 年度 4,242 千円：前仲)はタンパク質試料の大量調製にほぼ毎日稼働しており大変貢献している。

設備費以外の使途としては、計画研究では、博士研究員・技術員・事務補佐員の雇用と消耗品費が大半を占めており、公募研究では、ほぼ全ての研究費は消耗品費に当てられている。

10. 今後の研究領域の推進方策

研究の進展状況や対策あるいは成果等の項で述べたとおり、構造解析は予定以上に進んでおり、また、「チャレンジングな研究」課題や公募研究との共同研究も進展しており、有望な複合体結晶がいくつも得られている。これらのことを総合すると、今後の展開に大いに期待がもてる状態になってきていると思うので、推進方策に大きな変更はなく、各研究者が研究にできるだけ専念して、邁進できるようにしていきたいと思う。

班員の迅速な情報交換として、ニュースレターを月一回発行しており、紙媒体での発行はせずに、PDFファイルにしてe-mailで配布している。既に、18号に達しており、in press状態の最新論文のわかり易い説明図1枚と、abstract（英語）とわかり易い解説（日本語）をつけてもらっており、迅速に最新情報が理解できるようになっている。その他、班会議や関連学会シンポジウム、求人情報なども掲載して班員の利便を図っていく。

本領域が、構造生物学の良い「研究コミュニティー」になりつつあり、班員以外の研究者からも参加したいという要望があるので、次回からは、領域の全体会議（報告会）を拡大して、班員以外の研究者も「班友」のようなかたちで交えて、構造生物学のレベルアップや他の生物学領域への浸透に貢献したいと思う。できれば、若い研究者には旅費等の予算措置を考えたいと思う。

来年度の公募研究でも、前回同様に400万円と200万円（あるいは250万円）の2つに分けて、若手が申請しやすいようにしたいと思う。前回は、前者を20件、後者を10件予定したが、実際の応募状況を勘案して、前者を15件、後者を20件として、更に、若手のチャンスを確保したいと思う。

11. 総括班評価者による評価の状況

研究成果については、高インパクトの論文も出版され始めており、全体としては順調であるというという評価を得た（評価者全員）。

大きな成果が望める有望な結晶も様々な系で得られているので、成果に関して心配することではなく、「チャレンジングな研究」をじっくりと推進するようにとの助言もあった（月原）。

特に、他の新学術領域の評価等にも関わってきている評価者からは、本研究領域は若手研究者の参加が極めて多く、班会議等での報告や討論でも若手の活気あるアクティビティが伝わってきて、人材育成と言う観点からは際立っており、若手が育っている研究組織になっているという評価を得ている（貝淵・甲斐荘・吉田）。また、サイエンスのレベルも高いという印象も頂いた（月原・甲斐荘）。

分野については、構造研究の方法論としては、NMR の研究者の数が少ないように思うという意見もあった（甲斐荘）。

構造生物学関連の国の動向についての情報提供等がなされるとともに、本新学術の立ち位置についての考えをまとめるようにとの助言があった（磯貝）。

最近、生命科学分野で2つのCREST,

「ライフサイエンスの革新を目指した構造生命科学と先端的基盤技術」

（研究総括：田中啓二・東京都臨床医学総合研）と、

「生命動態の理解と制御のための基盤技術の創出」

（研究総括：山本雅・沖縄大学院/東京大学・医科研）

が始まった。また、研究開発施設共用等促進費補助金（創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業）も開始された。これらは、本研究領域とも関連の深い研究領域を含んでおり、また、CRESTの研究総括等が本新学術領域の班員でもある。そこで、CREST「構造生命科学」とは、情報発信等、例えばシンポジウム等の共同開催等、で連携していきたいとの提言もあった（田中）。

総括班評価者

				助言の専門
計画	月原富武	教授	兵庫県立大/阪大蛋白研	X線
	甲斐荘正恒	教授	名大理/首都大東京理/阪大蛋白研	NMR
	吉田賢右	教授	京都産業大学・総合生命	タンパク質生化学
	田中啓二	所長	東京都臨床医学総合研	生化学
	貝淵弘三	教授	名古屋大学・医	細胞生物学
	磯貝 彰	学長	奈良先端大	植物科学

研究成果の公表の状況（主な論文等一覧、ホームページ、公開発表等）

平成 22 年度に発足した新学術領域研究（研究領域提案型）としての研究成果の公表状況は以下のとおりであるので、一部修正して再掲する。

3. 研究成果公表の状況（主な論文等一覧、ホームページ、公開発表等）

(1) 主な論文等一覧

英文の原著論文（査読付き）が **198 報**，和文（総説等）が 26 報で，合計 **224 報**の論文を発表した（2012 年 5 月現在）。主な論文一覧を以下に記す。

I) 構造生物学関連

- 1) CENP-T-W-S-X forms a unique centromeric chromatin structure with a Histone-like fold. Nishino T, Takeuchi K, Gascoigne KE, Suzuki A, Hori T, Oyama T, Morikawa K, Cheeseman IM, *Fukagawa T. **Cell** **148**, 487-501 (2012).
- 2) The *Shigella flexneri* effector OspI deamidates UBC13 to dampen the inflammatory response. Sanada T, Kim M, Mimuro H, Suzuki M, Ogawa M, Oyama A, Ashida H, Kobayashi T, Koyama T, Nagai S, Shibata Y, Gohda J, Inoue J, * Mizushima T, *Sasakawa C.
(double corresponding authors)
Nature **483**, 623-626 (2012).
- 3) Crystal structure of an orthologue of the NaChBac voltage-gated sodium channel
Zhangl X, Ren W, DeCaen P, Yan C, Tao X, Tang L, JWang J, Hasegawa K, Kumasaka T, He J, Wang J, Clapham DE & *Yan N
Nature **486**, 130-135 (2012).
- 4) Structure and function of a membrane component SecDF that enhances protein export.
Tsukazaki T, Mori H, Echizen Y, Ishitani R, Fukai S, Tanaka T, Perederina A, Vassylyev DG, Kohno T, Maturana AD, Ito K, *Nureki O.
Nature **474**, 235-238 (2011).
- 5) Rotational movement of the formin mDia1 along the double helical strand of an actin filament.
Mizuno H, Higashida C, Yuan Y, Ishizaki T, Narumiya S, *Watanabe N.
Science **331**, 80-83 (2011).
- 6) Crystal structure of quinol-dependent nitric oxide reductase from *Geobacillus stearothermophilus*.
Matsumoto, Y., Toshi, T., Pislakov, A. V., Hino, T., Sugimoto, H., Nagano, S., Sugita, Y., *Shiro, Y.
Nature Struct. Mol. Biol. **19**, 238-245 (2012)
- 7) Structural basis of tRNA agmatinylation essential for AUA codon decoding.
Osawa T, Kimura S, Terasaka N, Inanaga H, Suzuki T, *Numata, T.
Nature Struct. Mol. Biol. **18**, 1275-1280 (2011).
- 8) Biogenesis of 2-agmatinylcytidine catalyzed by the dual protein and RNA kinase TiaS. Terasaka N, Kimura S, Osawa T, Numata T, *Suzuki T.
Nature Struct. Mol. Biol. **18**, 1268-1274 (2011).
- 9) miRNA-mediated deadenylation is orchestrated by GW182 through two conserved motifs that interact with CCR4-NOT.

- Fabian MR, Cieplak MK, Frank F, Morital M, Green J, Srikumar T, Nagar B, Yamamoto T, Raught B, Duchaine TF and *Sonenberg N,
Nature Struct Mol. Biol. **18**, 1211-1217 (2011)
- 10) Structure of the measles virus hemagglutinin bound to its cellular receptor SLAM. Hashiguchi T, Ose T, Kubota M, Maita N, Kamishikiryo J, *Maenaka K, *Yanagi Y.(double corresponding authors)
Nature Struct. Mol. Biol. **18**, 135-141 (2011).
- 11) An energy transduction mechanism used in bacterial flagellar type III protein export. Minamino T, Morimoto YV, Hara N, *Namba K.
Nature Commun. **2**, 475 (2011).
- 12) A role for mDia, a Rho-regulated actin nucleator, in tangential migration of interneuron precursors.
Shinohara R, Thumkeo D, Kamijo H, Kaneko N, Sawamoto K, Watanabe K, Takebayashi H, Kiyonari H, Ishizaki T, Furuyashiki T, *Narumiya S.
Nature Neurosci. **15**, 373-380 (2012).
- 13) Structural basis of Atg8 activation by a homo-dimeric E1, Atg7.
Nobuo N. Noda, Kenji Satoo, Yuko Fujioka, Hiroyuki Kumeta, Kenji Ogura, Hitoshi Nakatogawa, Ohsumi, Y. and *Inagaki, F.
Molecular Cell **44**, 462-475 (2011).
- 14) Tertiary structure and functional analysis of the Helicobacter pylori CagA oncoprotein.
Hayashi, T., Senda, M., Morohashi, H., Higashi, H., Horio, M., Nagase, L., Sasaya, D., Shimizu, T, Venugopalan, N., Kumeta, H., Noda, N. N., Inagaki, F., *Senda, T. and *Hatakeyama, M.
(double corresponding authors)
Cell Host Microbe, in press (2012).
- 15) Saturated Fatty Acid and TLR Signaling Link β Cell Dysfunction and Islet Inflammation.
Eguchi, K., *Manabe, I., Oishi-Tanaka, Y., Ohsugi, M., Kono, N., Ogata, F., Yagi, N., Ohto, U., Kimoto, M., Miyake, K., Tobe, K., Arai, H., Kadowaki, T., & *Nagai, R.
Cell Metab. **15**, 1-16. (2012)
- 16) Obesity resistance and increased hepatic expression of catabolism-related mRNAs in Cnot3^{+/-} mice.
Morita M, Oike Y, Nagashima T, Kadomatsu T, Tabata M, Suzuki T, Nakamura T, Yoshida N, Okada M, and *Yamamoto T,
EMBO J. **30**, 4678-4691 (2011)
- 17) Structural basis of cargo recognition by the myosin-X MyTH4-FERM domain.
Hirano Y, Hatano T, Takahashi A, Toriyama M, Inagaki N, *Hakoshima T.
EMBO J. **30**, 2734-2747 (2011).
- 18) Non-canonical UBA-UBL interaction mediates formation of linear ubiquitin chain assembly complex.
Yagi, H., Ishimoto, K., Hiromoto, T., Fujita, H., Mizushima, T., Uekusa, Y., Yagi-Utsumi, M., Kurimoto, E., Noda, M., Uchiyama, S., Tokunaga, F., Iwai, K., and *Kato, K.
EMBO rep. in press (2012).
- 19) Mechanistic insights into the activation of rad51-mediated strand exchange from the structure of a recombination activator, the swi5-sfr1 complex.
Kuwabara N, Murayama Y, Hashimoto H, Kokabu Y, Ikeguchi M, Sato M, Mayanagi K, Tsutsui Y, Iwasaki

- H, *Shimizu T.
Structure (Cell Press) **20**, 440-449. (2012)
- 20) Structure basis for the regulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity. via the intrinsically disordered protein CP12.
Matsumura H., Kai A, Maeda T, Tamoi M, Satoh A, Tamura H, Hirose M, Ogawa T, Kizu N, Wadano A, *Inoue T, *Shigeoka S. (double corresponding authors)
Structure (Cell Press) **19**, 1846-54 (2011).
- 21) Selective nuclear export mechanism of small RNAs.
Lee S. J., Jiko C., Yamashita E., *Tsukihara T.
Curr. Opin, Struc. Biol., **21**, 101-108 (2011)
- 22) Ice-binding site of snow mold fungus antifreeze protein deviates from structural regularity and high conservation.
Kondo, H., Hanada, Y., Sugimoto, H., Hoshino, T., Garnham, C. P., Davies, P. L., *Tsuda, S.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. in press (2012)
- 23) Structural basis of species-specific endotoxin sensing by innate immune receptor TLR4/MD-2
Ohto, U., Fukase, K., Miyake, K., and *Shimizu, T
Proc. Natl. Acad. Sci., USA **109**, 7421-7426 (2012)
- 24) The archaeal ribosomal stalk protein interacts with translation factors in a nucleotide-independent manner via its conserved C-terminus.
Nomura, N., Honda, T., Baba, K., Naganuma, T., Tanzawa, T., Arisaka, F., Noda, M., Uchiyama, S., Tanaka, I., Yao, M., *Uchiumi, T.,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **109**, 3748-3753 (2012).
- 25) Autoinhibition and phosphorylation-induced activation mechanisms of human cancer and autoimmune disease-related E3 protein Cbl-b. Kobashigawa Y, Tomitaka A, Kumeta H, Noda NN, Yamaguchi M, *Inagaki F.
Proc Natl Acad Sci USA **108**, 20579-84 (2011).
- 26) Specific recognition of linear ubiquitin chains by the Npl4 zinc finger (NZF) domain of the HOIL-1L subunit of the linear ubiquitin chain assembly complex.
Sato, Y., Fujita, H., Yoshikawa, A., Yamashita, M., Yamagata, A., Kaiser, S. E., Iwai, K., *Fukai, S.
Proc Natl Acad Sci USA **108**, 20520-5 (2011).
- 27) NMR basis for interprotein electron transfer gating between cytochrome c and cytochrome c oxidase.
Sakamoto K, Kamiya M, Imai M, Shinzawa-Itoh K, Uchida T, Kawano K, Yoshikawa S, *Ishimori K.
Proc Natl Acad Sci USA **108**, 12271-6 (2011).
- 28) Structural insight into maintenance methylation by mouse DNA methyltransferase 1 (Dnmt1).
Takeshita K., Suetake I., Yamashita E., Suga M., Narita H., Nakagawa A., *Tajima S.
Proc Natl Acad Sci USA **108**, 9055-9059 (2011).
- 29) Structural basis for the specific inhibition of heterotrimeric Gq protein by a small molecule. Nishimura A, Kitano K, Takasaki J, Taniguchi M, Mizuno N, Tago K, *Hakoshima T., *Itoh H.
(double corresponding authors)
Proc Natl Acad Sci USA **107**, 13666-13671 (2010).

- 30) Large Conformational Changes in Tubulin in the GTP- and GDP- States Microtubules Observed by Cryo Electron Microscopy
Yajima, H., Ogura, T., Nitta, R., Okada, Y., Sato, C. and *Hirokawa, N.
J. Cell Biol., in press (2012).
- 31) Crystal structure of the ligand binding domain of $\alpha 5\beta 1$ integrin: Atomic details of the fibronectin receptor.
Nagae, M., Re, S., Mihara, E., Nogi, T., Sugita, Y., *Takagi, J.
J. Cell Biol., **197**, 131-140 (2012).
- 32) Munc13-4 reconstitutes calcium-dependent SNARE-mediated membrane fusion.
Boswell KL, James DJ, Esquibel JM, Bruinsma S, Shirakawa R., Horiuchi H, *Martin TF,
J. Cell. Biol. **197**, 301-312 (2012).
- 33) Spindle microtubules generate tension-dependent changes in the distribution of inner kinetochore proteins.
Suzuki A, Hori T, Nishino T., Usukura J, Miyagi A Morikawa K. and *Fukagawa T.
J. Cell Biol. **193** 125-140 (2011).
- 34) Sorting of GPI-anchored proteins into ER exit sites by p24 proteins is dependent on remodeled GPI.
Fujita M, Watanabe R, Jaensch N, Romanova-Michaelides M, Satoh T., Kato M, Riezman H, Yamaguchi Y, Maeda Y, *Kinoshita T.
J. Cell Biol. **194**, 61-75 (2011).

II) 方法論関連

- 35) Growth of protein crystals in hydrogels prevents osmotic shocks
*S. Sugiyama, M. Maruyama, G. Sazaki, M. Hirose, H. Adachi, K. Takano, S. Murakami, T. Inoue, Y. Mori, and *H. Matsumura
J. Am. Chem. Soc. **134**, 5786-5789 (2012). Selected as a *JACS* Spotlights
- 36) Screw motion regulates multiple functions of T4 phage protein gene product 5 during cell puncturing.
Nishima, W., Kanamaru, S., Arisaka, F. and *Kitao, A
J. Am. Chem. Soc. **133**, 13571-13576 (2011).
- 37) The Atmospheric Scanning Electron Microscope with open sample space observes dynamic phenomena in liquid or gas.
*Suga, M., Nishiyama, H., Konyuba, Y., Iwamatsu, S., Watanabe, Y., Yoshiura, C., Ueda, T. and *Sato, C.,
Ultramicroscopy. **111**, 1650-1658 (2011)
- 38) Enantioselectivity of haloalkane dehalogenases and its modulation by surface loop engineering.
P rokop, Z., Sato, Y., Brezovsky, J., Mozga, T., Chaloupkova, R., Koudelakova, T., Jerabek, P., Stepankova, V., Natsume, R., van Leeuwen, J. G. E., Janssen, D. B., Florian, J., Nagata, Y., Senda, T. and *Damborsky, J.
Angew. Chem. Int. **49**, 6111-6115 (2010).

(2) ホームページ (HP)

HP は平成 22 年度 9 月に開設した。まず、フロントページで、本学術領域研究の立ち上げに至った経緯と基本的な考え方を紹介して、関連研究者や周辺研究者の理解を求めるとともに、賛同する研究者の参画を促すように勤めた（領域代表の挨拶）。この他、ニュース、研究、成果、組織、シンポジウム・領域会議、研究相談、お問い合わせのメニューをつけた。

研究のメニューでは、概要、研究推進図、研究の目的と意義を説明して、3つの研究項目での計画研究の概要と、公募研究の公募要領（文部科学省の科学研究費の公募要領に掲載したもの）と、〈補足〉と題して、公募要領の背景を説明して、各研究項目や、研究のタイプ（総額400万円以下と、200万円以下）への応募の判断が円滑にできるように配慮した。

成果のメニューでは、最新の発表論文の abstract と日本語による短い解説と説明図を一枚掲載することで、一般研究者等でも理解が得られるように工夫した。また、PubMedへリンクを張って、各雑誌のHPから原論文をダウンロードできるようにした。この記事は、毎月各研究班員へ配信するニュースレター（PDFファイル）の「Topics」欄にまとめてあり、各班員の利便を図った。

組織のメニューでは、各研究項目毎に、各研究班員の課題を掲載して、訪問研究者の本学術領域の理解を図った。また、シンポジウム・班会議メニューでは、本領域の総括班会議、研究領域の全体会議、幹事会、公開シンポジウムの予告等を掲載して、広く一般の訪問者に告知するとともに研究班員の利便を図っている。

(3) 公开发表等

シンポジウム・セミナー等

平成22年度は、6月末の採択通知を受けて、研究代表者の奈良先端・箱嶋が、申請書に基づいて5年間の具体的な運営分担や予定表を作成した。これをたたき台として、具体的な体制・方針・予定を決定するために、先ず、3つの研究項目の幹事予定者（A01 東大・深井、A02 産総研・千田、A03 北大・前仲）と箱嶋の4人で幹事会を東京（丸の内）で開催した。ホームページ（HP）の作成は前仲が担当することとして、早急に業者の選定と接触を開始した。

各年度1回の総括班会議・研究領域全体会議・公開シンポジウム、ならびに方法論連絡会の担当を決定した。特に公開シンポジウムは学会のシンポジウムやワークショップを利用することを確認した。このことは、文部科学省の学術審議官とも相談して了解を得た。そこで、12月10日には、BMB2010（神戸国際会議場）で「構造細胞生物学の新展開」（オーガナイザー：千田、深井、参加人数200人）を開催して、これからの5年間のこの新学術領域研究の方向性を、計画班員の研究を通して、多くのBMB参加研究者に公開した。

平成23年度は、6月9日には、第11回蛋白質科学会（大阪サンパレス）にて、公開シンポジウム（第1回方法論連絡会）としてワークショップ「タンパク質複合体研究のひと工夫」（オーガナイザー：千田、深井、参加人数150人）を開催して、複合体の構造研究の方法論に焦点を当てて、最新の技法や考え方を討論した。これは、新たに加わった公募班員も参加できる早い時期で、本領域参加研究者全員に新しい方法論やアプローチが周知できるという前年度総括班会議での検討の結果開催された。こういった構造生物学の方法論のセミナーやワークショップは好評なので、来年も続けることとした。

平成24年度は、第3回公開シンポジウム（第2回方法論連絡会）「先端的タンパク質研究のための実験技術」を、6月20日には、第12回蛋白質科学会（名古屋国際会議場）のワークショップ1WC（オーガナイザー：前仲勝実・千田俊哉、参加人数約200人）で開催した。150人用の部屋

で開催したが、参加者が入りきれずに多くの立ち見が出ており、タンパク質研究においては、実験技術や方法論への関心の強さを改めて確認した。

また、12月12日には、第35回日本分子生物学会（福岡国際会議場）では、ワークショップW63：「植物ホルモン受容体とシグナリングの分子レベルの生物学」（オーガナイザー：箱嶋敏雄，東大・経塚淳子）を開催して、分子生物学会非会員等の演者の旅費等の支援をする。更に、12月14日には、第85回日本生化学会（福岡国際会議場・マリンメッセ福岡）の大会企画シンポジウム「深化する構造生物学」（オーガナイザー：九大・神田大輔，稲垣冬彦）では、新進気鋭の構造生物学研究者，Dr CG Kalodimos (Rutgers University)の旅費等を支援することとしている。本新学術領域参画者が、これらのシンポジウムやワークショップで有益な新情報の収集や知的な刺激を受けて、研究推進に生かされることを期待している。

招待講演等

International symposium/workshops/Seminar 等での英語での講演が 52 件（国外での開催 29 件・国内開催 23 件），国内の学会等での日本語での講演が 70 件であり，合計 122 件の招待講演がある（2012年5月末日現在）。以下に主な講演を一覧する。

2012

- 1) Snake venom metalloproteinases: structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins.
Takeda S.
The 17th World Congress of the International Society on Toxinology, Honolulu, July 13 (2012)
- 2) Switching mechanism of flagellar motor rotation.
*Minamino, T.
Gordon Conference on Sensory Transduction in Microorganisms. Ventura, California, USA. Jan. 18 (2012).
- 3) Studies of the structure and molecular mechanisms of the proteasome assembly.
Mizushima, T.
The Annual Review Conference of the Global COE program of University of Hyogo, "Picobiology: Life Science at the Atomic Level" for the final fiscal year, Hyogo, Feb. 13 (2012).

2011

- 4) Structural cell biochemistry of a novel histone fold vertebrate kinetochore complex: CENP-TW and CENP-SX form a heterotetramer,
Nishino, T.
American Society for Cell Biology, Colorado, USA, Dec. 6 (2011).
- 5) Weak and transient interaction underlying the transcriptional corepressor SHARP/SMRT complex.
Mishima, M., Tepei Kanaba, Ayaho Kobayashi, Yutaka Ito, Suzuka Mikami
International Symposium on NMR (ISNMR2011), Yokohama, Nov. 17 (2011).
- 6) Development of interferogram extrapolation method for NMR experiments that requires accurate peak height,
Takumi Ueda, Masahiko Matsumoto, Ichio Shimada,
ISNMR2011, Yokohama, Nov. 17 (2011).
- 7) Thermodynamic analysis of multi-domain proteins with domain-domain interactions,
Uchiyama, S.
Development in Protein Interaction analysis 2011 (DiPIA2011), Boston, Nov. 14 (2011).

- 8) Structural view of plant hormone nuclear receptors.
Hakoshima, T., Murase, K., Hirano, Y. and Sun, T.-p.
International Symposium, Achievements and Future (Global COE), Nara, Nov. 8 (2011).
- 9) Structural basis of sugar recognition by intracellular lectins involved in glycoprotein transport and degradation.
Satoh, T.
"Toward Systems Glycobiology", Nagoya University Global COE Mini-Symposium, Nagoya, Nov. 7 (2011).
- 10) Structural basis for the transcriptional regulation by SHARP.
Mishima, M.
The 4th Asia-Pacific NMR Symposium, Beijing, Oct. 18 (2011).
- 11) Crystal structure reveals how spackle protein (gp61.3) inhibits lysozyme activity of gp5 tail lysozyme from bacteriophage T4.
Kanamaru, S.
XXIInd Biennial Conference on Phage/Virus Assembly, The Marine Sciences Institute, Oct. 9-14 (2011).
- 12) Crystal structure of recombination activator, Swi5-Sfr1 complex, from fission yeast
Shimizu T.
"New frontier of the research in Rad51 recombinase and its accessory proteins", Institut de Biologie Physico Chimique, France, Sep. 27-28 (2011).
- 13) Oxygen Activation and Oxidative Modification in Heme-Regulated Proteins
Ishimori, K.
14th Asian Chemical Congress, Bangkok, Thailand, Sept. 5-8, (2011).
- 14) Structural basis of cargo recognition by the myosin-X MyTH4-FERM domain.
Hirano, Y., Hatano, D., Toriyama, M. Inagaki, N. and Hakoshima, T.
"Microsymposium on signal transduction" in *IUCr General Assembly*, Madrid, Spain, August 24 (2011)
- 15) Structural analyses of mouse MD-1 protein complexed with endogenous phospholipid.
Ohto, U., Harada, H., and Satow, Y.,
IUCr General assembly, Madrid, Spain, August 24 (2011)
- 16) Structural basis for receptor recognition and entry of measles virus.
Hashiguchi T, Ose T, Kubota M, Sako M, Kajikawa M, Ito Y, Fukuhara H, Kuroki K, Maita N, Kamishikiryo J, Yanagi Y, Maenaka K.
MEASLES VIRUS MINI-SYMPOSIUM. Mayo Clinic, Rochester, USA July 15 (2011).
- 17) Structural cell biochemistry of a novel histone fold vertebrate kinetochore complex.
Nishino, T.
Gordon conference on Chromosome dynamics, Vermont, USA, July 12 (2011).
- 18) Mechanistic insights into the activation of the Rad51-mediated strand exchange from the structure of a recombination activator, the Swi5-Sfr1 complex
Shimizu, T.
"Symposium on Structure and Folding of Disease Related Proteins", Seoul National University, Korea, July 8 (2011)
- 19) New insight into the regulatory mechanism of G protein signaling.
Itoh, H.
"Structure and function of GPCR signaling system: the frontier of the future drug development", *JBS symposium*, Kyoto, May 22 (2011)

- 20) Heme-Mediated Iron Regulation.
H. Okutani, Y. Miyaji, Y. Takeda, T. Uchida, K. Iwai, and K. Ishimori
JBS Kyusyu Symposium, Kurume, Japan, May 21-22 (2011).
- 21) Structural basis of ubiquitin chain recognition by NZF domains for NF- κ B activation.
Fukai, S.,
TNF2011, Awaji, May 18 (2011)
- 22) Structure-Based Model of the Biological Signaling from Histone Modifications to Structural Change of the Nucleosome.
Senda, T.
“*International symposium on the physicochemical field for genetic activities*”, Awaji, Jan. 24-26 (2011).

2010

- 23) Mechanisms for recognition of K63-linked polyubiquitin chains
Fukai, S.
International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem2010), Hawaii, Dec. 19 (2010).
- 24) NMR studies of molecular interaction using PCS and nanodisc.
Inagaki, F.
Pacifichem2010, Honolulu, Hawaii, Dec. 15-20 (2010).

(4) 「国民との科学・技術対話」

国民との対話では、合計で **31 件** のアウトリーチ活動を行ってきている (2012 年 5 月末日現在)。これらの中には、所属機関である大学や研究所が定例で主宰しているアウトリーチ活動の一環として行ったものも多い。例えば、一般社会人や大学を対象とした「研究体験」、「サマースクール」、「サイエンスキャンプ」等である。参加人数も数名から数十人規模まで様々であり、アンケート結果もさまざまであるが、例えば、高校生 (長崎北陽台高校理数科生徒 21 人, 東大分生研訪問: 深井担当) の場合、講義・見学等の内容については、やはり難しいと感じた生徒が多かったが、とても興味深く、もっと知りたいという評判であった。

所属機関主宰のアウトリーチ活動にも、小学生等の子供向けのものや、高校生、大学生向け、あるいは、地方自治体と連携した一般市民向けの公開講座等、極めて多くのアウトリーチ活動が年間を通して企画されており、こういった体験学習や見学・講義と言った形態でのアウトリーチ活動は、ほぼ飽和状態になっているのではないかと思う。

少し珍しいアウトリーチ活動としては、高等学校で汎用されている教材や、高等学校の理科教師向けの情報誌への執筆がある。例えば、**フォットサイエンス生物図録** 新課程版 (鈴木孝仁監修) (数研出版:2011 年 12 月初版出版) 中の **囲み記事「Pioneer: ジベレリンの作用機構を解析**」を担当した (箱嶋)。この書籍は、高校生物の受験参考書・副読本として広く活用されており (年間 10 万冊!), 「Pioneer」は、研究の最前線とその研究室を紹介する記事であり、植物ホルモンの研究の最前線では、受容体タンパク質分子がホルモン分子をどのように識別して、その情報を如何に伝えるかという機能メカニズムを原子レベルで解析する構造生物学という分野が発展していることを紹介した。

また、全国の高等学校の理科教師向け機関誌、**理科通信「サイエンスネット」** 43(数研出版), 6-9 (2011). には、「植物ホルモン受容体の分子構造研究」と題して、植物ホルモンの理解の現状と、発見されてきた受容体タンパク質の特徴を平易に要約して、高校生物の延長線上につなげて、学生の興味を惹きつける授業の資料となるように配慮した(箱嶋).